



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

## التشخيص المجهرى والجزئى لطفيلي الأبوغ الخبيئة *Cryptosporidium parvum* في محافظة كربلاء المقدسة

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير

في علوم الحياة / علم الحيوان

من قبل

**أحمد حميد جاسم المرشدي**

(بكالوريوس تربية علوم الحياة / جامعة كربلاء-2008 م)

بإشراف

الأستاذ الدكتورة كوثر عبد الحسين مهدي الموسوي

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

تَرْفَعُ دَرَجَاتٍ مِّنْ نَّشَآءٍ ۗ وَفَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ عَلِیْمٌ

صدق الله العلي العظيم

(سورة يوسف الآية ٧٦)

## الإهداء

إلى مدينة العلم ..... أبي القاسم محمد صلى الله عليه واله وسلم سيد الأولين  
والآخرين من الخلق أجمعين..... .  
إلى سفينة النجاة وركابها ..... الأئمة الطيبين الأطهار عليهم السلام .....  
إلى معلمي الأول ووالدي الفاضل .... أبي العزيز  
إلى من ببركات دعواتها تتحقق الأمنيات ورضاها من أسمى الغايات ... أمي الغالية  
إلى من وقفت الى جانبي لتشد أزرى وبدعائها وفقني الله ..... زوجتي الحبيبة  
إلى من أجد فيهم النجوى لنفسي .. والصدى لروحي .. أخوتي وأخواتي ..  
إلى فلدات قلبي ونبض فؤادي ..... منتظر وملاك وسجى .

أهدي ثمرة جهدي المتواضع هذا

الباحث

## الشكر والتقدير

الحمد لله والشكر له كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه، ورضا نفسه وعدد خلقه وزنة عرشه ومداد كلماته ، الذي علم الأنسان بالقلم وعلمه ما لم يعلم ، والصلاة والسلام على أفضل الخلق أجمعين وحبیب إله العالمين محمد بن عبد الله الرسول للبشرية ونبي الإنسانية وعلى اله الطيبين الطاهرين .

يسرني وانا أنهي رسالتي ان أتوجه بوافر الشكر والتقدير الى أستاذتي المشرفة الفاضلة الأستاذة الدكتورة كوثر عبد الحسين مهدي الموسوي لاقتراحها موضوع الرسالة ولأشرافها ومتابعتها العلمية ودعمها المعنوي والعلمي المتواصلين وإرشاداتها القيمة وملاحظاتها السديدة لإنجاز البحث على أتم وجه فجزاها الله عني خير الجزاء ، كما أعبّر عن شكري وأمتناني وأعتزازي وتقديري الى كل من أستاذي الفاضل الأستاذ المساعد الدكتور حيدر علي محمد معاون العميد لكلية الطب البيطري / جامعة كربلاء الذي أرشدني في الحصول على البرايمرات والأستاذ المساعد الدكتورة كوكب عبد الله السعدي تدريسية في كلية العلوم / جامعة كربلاء لتوجيهاتهم العملية والعلمية ونصائحهما فلمني كل الشكر والاحترام .

كما أتقدم ببالغ شكري وتقديري الى رئاسة جامعة كربلاء والى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة لأتاحة الفرصة لا كمال دراستي وشكري الخاص الى رئيس قسم علوم الحياة الأستاذ المساعد الدكتور نصير مرزا حمزة والى الدكتور يعرب مضر القزويني والى جميع أساتذة القسم لجهودهم المبذولة في دعم طلبة الدراسات العليا راجياً من المولى أن يحفظهم ويوفقهم لما فيه خير .وكما أتقدم بالشكر والتقدير لكل زملائي وزميلاتي من طلبة الدراسات العليا وجميع من مد يد العون والمساعدة لإنجاز هذا البحث سائلاً العلي القدير أن يوفق الجميع .

عرفاناً بالجميل أتقدم بجزيل الشكر الى رئيس ومنتسبي مختبر الطفيليات في مدينة الامام الحسين (ع) الطبية ورئيس ومنتسبي مختبر الطفيليات في مستشفى كربلاء التعليمي للأطفال لما قدموه لي من مساعدة في جمع العينات واستخدام الأجهزة المختبرية ودعم وأسناد لإنجاز هذا البحث .

وختاماً يسرني أن أعبّر عن عميق حبي وأعتزازي الى والدي وأخوتي وزوجتي العزيزة وأولادي الاحبة الذين تحملوا مني الكثير طيلة مدة الدراسة ... وتقديراً لكل من ساندني بدعاء خالص سائلاً المولى القدير الوفاء لهم .

الباحث



## الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى تشخيص طفيلي الأبواغ الخبيثة (*Cryptosporidium parvum*) والتعرف على مدى أنتشار الطفيلي عند الأشخاص الذين يعانون من الاسهال وعلاقته بالعوامل الوبائية في محافظة كربلاء المقدسة بأستخدام ثلاث طرائق تشخيصية مختلفة ، الفحص المجهرى والفحص المناعي الكروماتوكرافي و الفحص الجزيئي ، جمعت العينات من مدينة الحسين (ع) الطبية ومستشفى كربلاء التعليمي للأطفال أما بقية خطوات الدراسة فتمت في مختبرات كلية الطب البيطري في جامعة كربلاء للمدة من شهر أيلول 2020 ولغاية شهر شباط 2021. تم جمع 320 عينة براز من الأشخاص الذين يعانون من الاسهال مع 20 شخص اصحاء كمجموعة سيطرة والذين حضروا الى مدينة الامام الحسين (ع) الطبية ومستشفى كربلاء التعليمي للأطفال ومن كلا الجنسين وبفئات عمرية من (1-50) سنة ، تم تقسيم كل عينة على جزأين ، تم استخدام الجزء الأول لتحضير مسحات سميكة معتدلة للفحص بالصبغة الحامضية المعتدلة والجزء الثاني حفظ بدرجة حرارة - 20 للأستخدام فيما بعد بالفحص الجزيئي ، اذ أظهرت نتائج الفحص المجهرى بأستخدام الصبغة الحامضية المعتدلة أن عدد العينات المصابة بلغت 26 عينة اذ كان عدد الذكور 15 عينة بينما بلغ عدد الاناث 11 عينة وبلغت نسبة الإصابة الكلية 8.1 % ، بينما كانت نسبة الإصابة أقل بأستعمال الأختبارات المناعية بنسبة 6.8 % .

تأثرت نسبة الإصابة بالعوامل الوبائية تحت مستوى احتمالية  $P \leq 0.05$  ، اذ سجلت الذكور نسبة أعلى للإصابة مقارنة مع الاناث اذ بلغت نسبة الإصابة 10 % ، 6.47 % ، على التوالي كما سجلت نسبة الإصابة فروقاً معنوية بحسب نوع السكن اذ بلغت نسبة الاصابة 12.2 % في الريف وفي المدينة بلغت نسبة الإصابة 6.5 % فضلاً عن ذلك سجلت الدراسة الحالية نسب أصابه مختلف بحسب أشهر السنة اذ كانت اعلى نسبة اصابة في شهر كانون الأول بنسبة 16 % في حين كانت أدنى نسبة اصابة تركزت في شهر تشرين الأول بنسبة 1.8 % ، وسجلت الدراسة أعلى نسبة للإصابة عند الفئة العمرية 1-10 بنسبة 14.1 % بينما لم تسجل الدراسة الحالية أي إصابة لدى الفئة العمرية 31-40 . ولعبت مصادر مياه الشرب دوراً في أنتشار طفيلي الأبواغ الخبيثة اذ أظهرت الدراسة فروقا معنوية في نسب الإصابة اذ بلغت عند الأشخاص الذين يعتمدون على مياه الحنفية 18.9 % بينما كانت أدنى نسبة عند الأشخاص الذين يستعملون المياه المعقمة للشرب بواقع 4.8 % . أما فيما يتعلق بالطفيليات المرافقة فقد سجلت الدراسة الحالية أن أكثر الطفيليات المرافقة هو طفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba*

*histolytica* بنسبة 3.4% بينما كان ظهور طفيلي جيارديا اللامبليية *Girdia lamblia* أقل بنسبة أصابة 2.1% .

أستخدم الفحص الجزيئي على الجزء الثاني من العينات والمحفوظ عند درجة حرارة - 20 لغرض تأكيد الإصابة في العينات الموجبة وغيرها ولتحديد التشخيص الدقيق لهذا الطفيلي تم استخدام بواىء محددة لجين بروتين جدار البيض (*COWP*) *Cryptosporidium oocyst* wall protein ، وقد شمل الفحص الجزيئي مرحلتين من تفاعل البلمرة ، المرحلة الأولى كانت تفاعل البلمرة المتسلسل (*Polymerase chain reaction* (PCR) اذ تم تضخيم الحامض النووي باستخدام بادئات محددة وتم أنجاز التفاعل باستخدام جهاز المدور الحراري وتحت الظروف المثلى وقد كشفت النتائج عن حزمة واحدة ( Singal band ) في هلام الاكاروز (*Agarose gel*) ذات وزن جزيئي 769 زوج من القواعد النيتروجينية (base pairs) في الدنا المستخلص من عينات براز الأشخاص المصابين بداء الأبواغ الخبيثة ، اما المرحلة الثانية فتمت بها استخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل *Nested PCR* تم في هذه المرحلة تحليل النمط الجيني للجين *COWP* بواسطة أستعمال نوعين من البادئات المحددة في التفاعل (*COWP R* و *COWP F*) اذ تم تضخيم الحامض النووي باستخدام بادئات محددة وتم أنجاز التفاعل باستخدام جهاز المدور الحراري وتحت الظروف المثلى ، أظهرت النتائج عن وجود حزمة واحدة في هلام الاكاروز ذات وزن جزيئي 553 زوج من القواعد النيتروجينية في الدنا المستخلص من عينات براز الأشخاص المصابين بداء الأبواغ الخبيثة وهي دلالة على إصابة المريض بالطفيلي ، وأظهرت الدراسة الحالية أن حساسية الفحص المجهرى كانت أقل من الفحص الجزيئي اذ بلغت 75% بينما كانت حساسية الفحص المناعي أعلى من الفحص المجهرى بنسبة 88% .

أستنتج من هذه الدراسة أن طفيلي الأبواغ الخبيثة من الطفيليات المسببة للإسهال عند الإنسان لاسيما عند الأطفال في محافظة كربلاء ويمكن تشخيصه بعدة طرائق تشخيصية وتعد طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل من أفضل الطرائق التشخيصية .

## قائمة المحتويات

الصفحة	العنوان	التسلسل
أ	الخلاصة	
ت	المحتويات	
خ	قائمة الجداول	
د	قائمة الأشكال	
ذ	قائمة المختصرات	
الفصل الأول / المقدمة		
1	المقدمة	1.1
3	هدف الدراسة	2.1
الفصل الثاني / استعراض المراجع		
4	نبذة تاريخية	1.2
5	تصنيف الطفيلي	2.2
5	شكل وتركيب الطفيلي	3.2
8	دورة الحياة	4.2
10	خصوصية المضيف من الطفيلي	5.2
12	طرائق الإصابة	6.2
14	العوامل المؤثرة في كثافة وانتشار الطفيلي	7.2
17	الإمراضية	8.2
18	داء الأبواغ الخبيثة	9.2
20	وبائية داء الأبواغ الخبيثة	10.2

23	التشخيص	11.2
23	العلامات السريرية	1.11.2
23	التشخيص المختبري	2.11.2
24	الاختبارات المناعية الكروماتوكرافية	3.11.2
25	التشخيص الجزيئي	4.11.2
27	اللية اختراق خلية المضيف	12.2
28	الاستجابة المناعية	13.2
29	العلاج	14.2
30	السيطرة والوقاية	15.2
<b>الفصل الثالث / المواد وطرائق العمل</b>		
31	مواد العمل	1.3
31	الأجهزة والمستلزمات المختبرية	1.1.3
32	المواد الكيميائية	2.1.3
33	العدد المختبرية	3.1.3
34	تصميم الدراسة	2.3
35	مرضى الاسهال	1.2.3
35	جمع عينات البراز	3.2.2
35	تحضير المحاليل والصبغات	3.3
36	طرائق العمل المختبرية	4.3
37	فحص العينة	1.4.3
37	الفحص العياني	1.1.4.3

37	الفحص المجهري	2.1.4.3
39	الاختبار الكروماتوكرافي المناعي	2.4.3
40	الفحص الجزيئي	3.4.3
49	التحليل الأحصائي	5.3
49	الحساسية والخصوصية	6.3
الفصل الرابع / النتائج		
50	تشخيص داء الأبواغ الخبيثة	1.4
50	نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب طريقة الفحص في كربلاء	2.4
51	نتائج الدراسة المجهرية	1.2.4
51	نتائج الفحص المجهري باستعمال الصبغة الحامضية المعدلة	1.1.2.4
51	نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب الجنس	1.1.1.2.4
52	نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب الفئات العمرية	2.1.1.2.4
53	نسبة الأصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة خلال أشهر السنة	3.1.1.2.4
53	نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب نوع السكن	4.1.1.2.4
54	نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب مصدر مياه الشرب	5.1.1.2.4
55	نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب وجود بعض الطفيليات المرافقة.	6.1.1.2.4
56	نتائج الفحص المجهري باستخدام طريقة التطويق	2.1.2.4
57	نتائج الاختبار الكروماتوكرافي المناعي	2.2.4
57	الدراسة الجزيئية	3.2.4
57	نتائج الدراسة الجزيئية باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل	1.3.2.4
58	نتائج الدراسة الجزيئية باستخدام تفاعل البلمرة المتداخل	2.3.2.4
60	الحساسية والنوعية بين الفحوصات المخبرية للكشف عن طفيلي الأبواغ الخبيثة.	4.2.4

الفصل الخامس / المناقشة		
63	نسبة الإصابة بداء الأبواغ الخبيثة	1.5
64	نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب طريقة الفحص في محافظة كربلاء	2.5
66	نتائج الفحص المجهرى باستخدام الصبغة الحامضية المعدلة	1.2.5
66	الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب الجنس	1.1.2.5
67	الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب الفئات العمرية.	2.1.2.5
68	الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة خلال أشهر السنة	3.1.2.5
69	الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب نوع السكن	4.1.2.5
70	الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب مصدر مياه الشرب	5.1.2.5
70	الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب وجود بعض الطفيليات المرافقة.	6.1.2.5
71	الدراسة المناعية الكروماتوجرافية	2.2.5
71	الدراسة الجزيئية	3.2.5
71	دراسة الحساسية والنوعية بين الفحوصات المختبرية للكشف عن طفيلي الأبواغ الخبيثة	4.5
الاستنتاجات والتوصيات		
73	الاستنتاجات	1.6
74	التوصيات	6.2
المصادر		
75	المصادر العربية	
76	المصادر الأجنبية	
109	الملاحق	

## قائمة الجداول

الرقم	العنوان	الصفحة
1.2	بعض أنواع طفيلي الأبواغ الخبيثة والمضائف التي تصيبها وموقع الإصابة	11
2.2	بعض الدراسات التي أجريت في بعض المدن العراقية حول الطفيلي	22
1.3	الأجهزة والمستلزمات المختبرية المستعملة في هذه الدراسة والشركات المصنعة لها وبلد المنشأ.	31
2.3	المواد البايولوجية والكيميائية المستعملة في الدراسة الحالية	32
3.3	مكونات عدة استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين	41
4.3	البادئات المستعملة لتضخيم جين الـ(COWP) لطفيلي الأبواغ الخبيثة	44
5.3	المزيج الرئيسي لتفاعل البلمرة المتسلسل PCR	44
6.3	ظروف تفاعل جهاز المدور الحراري	45
7.3	تحضير المزيج الرئيسي المتداخل	47
8.3	ظروف تفاعل جهاز المدور الحراري المتداخل	48
1.4	النسبة المئوية للإصابة حسب طرائق الفحص المجهرية والمناعية والجزئية	50
2.4	2-4 النسب المئوية للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب الجنس	52
3.4	النسب المئوية للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب الفئات العمرية	52
4.4	النسب المئوية للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة خلال أشهر الدراسة	53
5.4	النسب المئوية للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب نوع السكن	54
6.4	نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب مصدر مياه الشرب	54
7.4	النسب المئوية للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب الطفيليات المرافقة	55
8.4	يوضح الحساسية والنوعية بين الفحص المجهرية والفحص المناعي	60
9.4	الحساسية والنوعية بين الفحص المجهرية والفحص المناعي	61
10.4	يوضح الحساسية والنوعية بين الفحص المناعي والفحص الجزيئي	62

قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	الرقم
6	كيس البيض لطيفلي الأبواغ الخبيثة	1.2
7	الطور الخضري لطفيليات معقدات القمة	2.2
9	دورة حياة طفيلي الأبواغ الخبيثة	3.2
14	الطرائق الرئيسية للإصابة بطفيلي الابواغ الخبيثة	4.2
26	خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	5.2
28	اللية اختراق طفيلي الابواغ الخبيثة لخلية المضيف	6.2
34	مخطط تصميم الدراسة	1.3
38	شكل يوضح عملية التطويق لعينات البراز بأستخدام محلول شيدر السكري	2.3
51	صورة واضحة لأكياس بيض طفيلي الأبواغ الخبيثة والمعزولة من براز الإنسان بعد تصبيغها بالصبغة الحامضية المعدلة	1.4
56	مسحة رطبة من أكياس البيض لطيفلي الأبواغ الخبيثة المعزولة من براز الإنسان بطريقة التطويق بمحلول شيدر السكري بعد فحصها بقوة 100	2.4
57	تشخيص طفيلي الأبواغ الخبيثة باستخدام طريقة الفحص المناعية الكروماتوجرافية	3.4
58	الترحيل الكهربائي لنتائج تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل	4.4
59	الترحيل الكهربائي لنتائج تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل المتداخل	5.4



## قائمة المختصرات

Manual	Address
CD4	is a glycoprotein expressed on the surface of T helper cells.
CD8	is a transmembrane Glycoprotein on the surface of T cytotoxic cells.
CSL	Cerebellar soluble lectin
COWP	<i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein
DNA	Deoxy ribonucleic acid
ELISA	Enzyme linked immune Sorbent Assay
FDA	Food and drug administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HBV	Hepatitis B virus
HIV	Human immunodeficiency virus
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
MPO	Myeloperoxidase
N PCR	Nested Polymerase chain reaction
NTZ	Nitazoxanide
PCR	Polymerase chain reaction
PGE	Prostaglandin
pH	power of hydrogen
R.O	Reverse osmosis

SEM	Scanning electron microscop
SSUrRNA	Small subunit ribosomal RNA gene
TD	Traveller diarrhea
TEM	Transmisson Electron Microscope
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
WHO	World health Organization

الفصل الأول

المقدمة

**Introduction**

## الفصل الأول

### المقدمة Introduction

#### 1.1 المقدمة Introduction

يعد طفيلي الأبواغ الخبيثة (*Cryptosporidium parvum*) من الطفيليات أحادية الخلية إجبارية التطفل داخل الخلايا (*Obligate intracellular parasite*). سميت بخفيات الأبواغ (*Hidden sporocysts*) لصعوبة معرفتها داخل كيس البيض وحجمه يكون أصغر من حجم كرية الدم الحمراء إذ يبلغ حجمه (4-5) مايكرومتر ويعود هذا الطفيلي إلى شعبة معقدات القمة (*Apicomplexa*) لأنه يحتوي على تركيب قمي يساعده في اختراق خلية المضيف (*Oyibo et al., 2011*)، ولا يستخدم الطفيلي الحشرات كمضائف وسطية للإصابة إذ يستطيع إكمال دورة حياته داخل مضيف واحد وأنتاج أكياس البيض التي تطرح مع البراز أو مع السعال الرطب والانتقال إلى مضيف جديد (*Sponseller et al., 2014*). يسبب هذا الطفيلي داء الأبواغ الخبيثة (*Cryptosporidiosis*) وهو أحد مسببات الأمراض المعوية الشائعة عند البشر والحيوانات في جميع أنحاء العالم ويعد واحد من الأمراض الانتهازية المشتركة بين الإنسان والحيوان ويأتي بالمرتبة الرابعة من بين مسببات الإسهال في العالم لاسيما عند الأفراد المنقوصي المناعة (*Immunocompromised*) (*Costa et al., 2020*)، في حين يكون غير مرضي أو عديم الأعراض (*Asymptomatic*) عند الأشخاص المؤهلين مناعياً (*Immunocompetent*) مما يؤدي إلى عدم معرفة الإصابة بالمرض (*Razakandrainibe et al., 2019*). يعد هذا الطفيلي سبباً رئيساً للإسهال عند الأطفال دون سن الخامسة والأشخاص الذين يعانون من ضعف المناعة (*Squire & Ryan, 2017*). إذ يتسبب في مجموعة من أمراض الجهاز الهضمي والتنفسي ويسمى داء خفيات الابواغ المعوي أو داء خفيات الابواغ التنفسي (*Dyab et al., 2018*).

تشمل طرائق انتقال الطفيلي أما بصورة غير مباشرة من خلال الفم عن طريق شرب المياه وتناول الطعام الملوث بالأكياس البيضية إذ يشكل تواجد أكياس البيض في المياه خطراً كبيراً على الصحة العامة وقد يؤدي إلى حدوث أوبئة في مناطق مختلفة من العالم ويعد هذا الطفيلي من أهم مسببات الأمراض التي تنتقل عن طريق تلوث المياه في البلدان المتقدمة وقد تسبب هذا الطفيلي في أكبر انتشار للأمراض المنقولة عن طريق المياه (*Li et al., 2015*)، أو بصورة مباشرة من خلال الاتصال بالأشخاص و الحيوانات المصابة إذ تنتقل أكياس البيض من حيوان إلى حيوان أو من حيوان إلى إنسان أو من الإنسان إلى حيوان أو من إنسان مصاب إلى إنسان سليم (*Dumaine et al., 2020*). إذ تم عزل الطفيلي لأول مرة من فأر مصاب عام 1907 (*Rider & Zhu, 2008*)، وتم تشخيص أول حالة من خفيات الابواغ البشرية عام

1976 (Ibrahim *et al.*, 2017). يتميز هذا الطفيلي بقدرته على مقاومة المطهرات والمعقمات إذ يستطيع أن يعيش لمدة 24 ساعة في محلول يحتوي على الكلور الحر وكذلك أكياس بيض هذا الطفيلي تستطيع ان تبقى نشطة في المياه اكثر من 24 ساعة و تصيب المضيف (Xiao & Cama , 2006). يعد هذا الطفيلي من الطفيليات التي لها القدرة على مهاجمة الخلايا الظهارية المبطنه للأمعاء مسبباً إسهالاً مائياً غزيراً (Watery diarrhea) يمكن أن يستمر حتى 3 أسابيع فضلاً عن أنه يمكن أن يؤدي إلى سوء التغذية وكذلك غثيان وارتفاع درجة الحرارة والام في منطقة البطن لاسيما في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة (Squire & Ryan , 2017)، وقد يتحول المرض الى النوع المزمن في الأشخاص الذين يعانون من تثبيط الجهاز المناعي مثل مرضى الايدز ومستلمي الأعضاء المزروعة والمصابين بأمراض الكلى والنساء الحوامل وكذلك الذين يتلقون العلاج الكيميائي للسرطان مما يؤدي إلى حدوث الوفاة نتيجة الإصابة بهذا المرض (Ibrahim *et al.*, 2017) ، تتميز الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بأنها مرتبطة بتطور الطفيلي داخل طبقة الزغابات من الخلايا الظهارية المعوية للجهاز الهضمي للمضيف مما يؤدي الى ضمور الزغابات (Villi atrophy) والزيادة المتغيرة في خلايا الدم البيض ويُعتقد أن أعراض الإسهال المائي وسوء الامتصاص مرتبطة بسوء امتصاص الصوديوم ، وترتبط شدة المرض بتغيير نفاذية الأمعاء (Sparks *et al.* , 2015).

تشارك العديد من العوامل في أنجاح عملية التفاعل التي تحدث بين الأكياس البيضية والخلايا الظهارية للمضيف بما في ذلك الخروج والانطلاق من الكيس (Excystation) وحركة الانزلاق (Gliding motility) والتعلق (Attachment) والغزو (Invasion) وتشكيل الفجوة الحاملة للطفيلي (Parasitophorous vacuole formation) وتلف الخلايا المضيفة (Host cell damage) (Fayer *et al.*, 2007). تستطيع الأنواع التابعة الى طفيلي الأبواغ الخبيثة إصابة مدى واسع من المضيفات تصل الى 170 مضيف كالزواحف والطيور والبرمائيات واللبائن والأسماك وبضمنها الانسان (Sunnotel *et al.*, 2010)، وقد تم التعرف على أكثر من 27 نوع من طفيلي الأبواغ الخبيثة تصيب مجموعة واسعة من الثدييات والزواحف والطيور والاسماك (Ryan *et al.*, 2014). يعد *C. parvum* و *C. hominis* أكثر الأنواع شيوعاً بالإضافة إلى *C. felis* و *C. canis* و *C. meleagridis* و *C. muris* والمسؤولان عن أغلب حالات داء الأبواغ الخبيثة في الإنسان (Cabada *et al.*, 2015) ، واستطاع (Ali *et al.* (2014) ان يبينوا من خلال دراساتهم ان طفيلي الأبواغ الخبيثة يعد من اكثر مسببات الأمراض المعوية انتشارا في العالم.

## 1.2: هدف الدراسة Aim of Study

تم تحقيق هدف الدراسة الحالية من خلال تحقيق المحاور التالية .

1- تهدف الدراسة الحالية إلى تشخيص طفيلي الأبواغ الخبيثة بطرائق التشخيص المجهرى والمناعى والجزئى فى عينات البراز من مرضى محافظة كربلاء .

2- دراسة العلاقة بين مدى أنتشار الإصابة بهذا الطفيلى فى محافظة كربلاء المقدسة وبعض العوامل الوبائية مثل الجنس وعمر المريض ومنطقة السكن والفترة الذى أخذت فيه العينة.

3- تقييم وتحديد الطريقة الأكثر فاعلية للتشخيص من خلال معرفة حساسية ونوعية التشخيص المجهرى والمناعى والجزئى.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

**Literature Review**

## الفصل الثاني

### استعراض المراجع Literatures Review

#### 1.2: لمحة تاريخية Historical Background

عرف طفيلي الأبواغ الخبيثة في أواخر القرن التاسع عشر بوصفه أحد المسببات الرئيسية للأسهال في الإنسان لاسيما عند الأطفال، ويعد العالم Jackson Clark في عام 1895 أول من اكتشف طفيلي الابواغ الخبيثة في الجهاز الهضمي للفئران وحدده في العديد من المضائف الفقرية ووصفها بأنها حشود كبيرة من الأبواغ Swarm spores (Fayer , 2009)، وأن أول من ميز طفيلي الأبواغ الخبيثة هو العالم Ernest Edward Tyzzer عام 1907 عندما شاهده في الغشاء المخاطي المعدي لفئران التجارب (Rider & Zhu, 2008). اذ تم التعرف على الطفيلي كمصدر لمرض الاسهال في الحيوانات أولاً وبعد ذلك عند البشر (Caccio & Putignani , 2014). إن الأهتمام بطفيلي الأبواغ الخبيثة كان ضعيفاً في مرحلة ما قبل السبعينات حتى تم الكشف عن العديد من الإصابات عام 1971 في مضائف مختلفة شملت اللبائن والطيور والزواحف وبضمنها الإنسان (الطار والخطيب ، 1999)، وقد تم تشخيص حالات عديدة لداء خفيات الأبواغ في الإنسان عام 1976 منها في مريض عمره 39 يعاني من نقص المناعة مع أسهال مائي شديد وطفلة تبلغ من العمر 3 سنوات في منطقة Tennessee الريفية في النصف الجنوبي من الولايات المتحدة الأمريكية تعاني من التهاب المعدة والأمعاء مع ألم بطني واسهال مائي (Davidson, 2010 ; Crawford et al., 1988)، وفي عام 1978 تم الكشف عن ان أكياس البيض تطرح من المضائف المصابة (Pohlenz et al., 1978)، منذ ذلك الحين تم دعم التشخيص من خلال ظهور أكياس البيض في البراز (Tzipori & Campbell, 1981). في وقت لاحق من الثمانينات تم الكشف على ان طفيلي الأبواغ الخبيثة سبباً للوفاة في مرضى الايدز مما يؤكد على اهمية النظافة العامة للتخلص من هذا الطفيلي وتكون الاصابة محددة ذاتيا بشكل منتظم وتستمر من اسبوع إلى اسبوعين في الأفراد ذوي الكفاءة المناعية في حين أن الاشخاص الذين يعانون من نقص المناعة غالبا ما يعانون من اسهال مائي حاد ومستمر ويمكن أن يتسبب في الوفاة في مرحلة الطفولة المبكرة وكذلك ترتبط الإصابة بـ خفيات الابواغ باضطراب سوء التغذية (Checkley et al., 1998).

منذ عام 1976 حتى عام 1982 تم تسجيل سبع حالات من الابواغ الخبيثة في البشر خمس منها كانت في مرضى ضعف المناعة (Guerrant, 1997). وفي عام 1982 تم توثيق داء خفيات الأبواغ كسبب للإسهال الحاد الذي يهدد الحياة لدى مرضى الإيدز وهو سبب مهم للإسهال لدى الأطفال والبالغين في البلدان المتقدمة والنامية (Xiao&Cama, 2007). ذكر (Shinta et al. (2004 ان مرض خفيات الابواغ اصبح مرضاً وبائياً واطلق عليه اسم اسهال المسافرين Traveller Diarrhea



(TD) لأنه ينتقل بين المسافرين عن طريق المرافق الصحية العامة في مطارات العالم إذ وجد أنتقال الطفيلي بهذه الطريقة يشكل 20-60% في أمريكا الشمالية وأوروبا ، وأستطاع (Pettoello) (1995) *Mantovani et al.* أن يوضح أن طفيلي الابواغ الخبيثة يمتلك مقاومة لأكثر الأدوية والمعقمات ويستطيع ان يسبب التهاب المعدة والامعاء في الانسان والحيوان .

وقد أشار (Snodgrass *et al.* 1984) إلى أول إصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بين الأغنام بأستراليا. في حين أوضح (Dawson 2005) أن طفيلي الأبواغ الخبيثة أصبح خطراً على جميع مصادر المياه في كل أنحاء العالم لأن أكياس البيض تنتقل عن طريق المياه. و استطاع (Tzipori 1988) من خلال دراسة قام بها أن يميز بين الأنواع *C. parvum* و *C. muris* عندما اثبت تجريبيا ان النوع الثاني يتطور في الجهاز الهضمي للفئران المصابة.

## 2.2: تصنيف الطفيلي Taxonomy of parasite

صنف العديد من الباحثين طفيلي الابواغ الخبيثة اعتماداً على مجموعة من الأسس التصنيفية منها حجم كيس البيض ونوع المضيف وموقع الإصابة وبحسب ماورد من قبل (Dumaine *et al.*, 2020). فأن طفيلي الأبواغ الخبيثة يصنف كالآتي :

Kingdom: Protista

Phylum: Apicomplexa

Class: Sporozoa

Subclass: Coccidiasina

Order: Eucoccidiorida

Sub-order: Eimeriorina

Family: Cryptosporidiidae

Genus: *Cryptosporidium*

Species: *parvum*

## 3.2: شكل وتركيب الطفيلي Morphology and Structure of Parasite

يظهر طفيلي الأبواغ الخبيثة خلال دورة حياته بسبعة أشكال وهي ( كيس البيض ، البويضات ، الطور الخضري ، المفلوقات ، الخلية المشيجية الذكرية ، الخلية المشيجية الأنثوية والبيضة المخصبة).

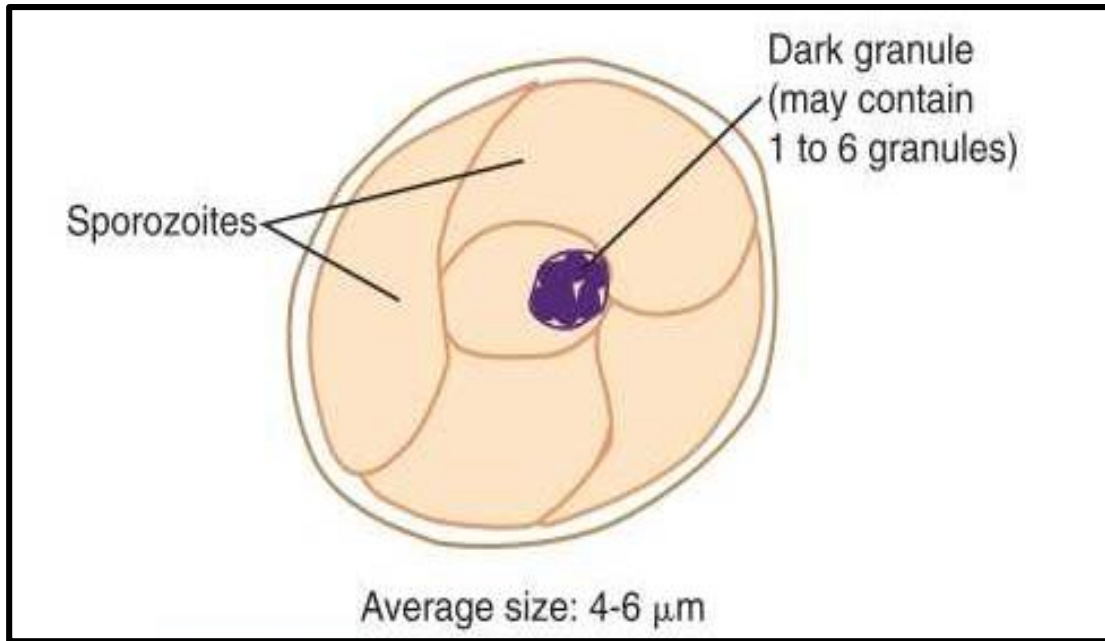
### 1.3.2: كيس البيض Oocyst

تتميز الأكياس البيضية لطفيلي الابواغ الخبيثة بأنها صغيرة الحجم (Fall *et al.*,2003). وذات شكل كروي إهليجي محدب من جهة ومسطح من جهة اخرى أو بيضوي في المظهر ويحتوي على أربعة أبواغ هلالية متوازية ويمكن أن تعيش الأكياس البيضية لفترة طويلة خارج الجسم في الماء

والتربة إذ يمكنها العيش في البيئة الخارجية لمدة 18 شهراً (Finish & Tawfeek,2013). وتكون أيضاً شديدة المقاومة للكور والمطهرات المنزلية الشائعة ولديها القدرة على المرور عبر عمليات معالجة المياه الفيزيائية (Sunnotel *et al.*, 2010). يتراوح قطر كيس البيض من 4-5 ما يكرمتر تحيط به أغشية في أحد طرفي الطبقة الداخلية والتي من خلالها تخرج البويغات ( Morgan- Ryan *et al.*, 2002). إذ أوضحت الدراسات أن جدران كيس البيض لطيفلي الأبواغ الخبيثة يتكون من ثلاث طبقات وهي طبقة خارجية (Outer layer) تكون غير منتظمة الشكل وتتكون من بروتينات سكرية Glycolipids ، والطبقة المتوسطة وتتميز بصلابتها و تتكون من شحوم سكرية Lipoproteins وبروتينات دهنية وتكون مسؤولة عن اكتساب الصبغة الحامضية المعدلة التي تصطبغ بها أكياس البيض أما الطبقة الداخلية (Inner layer) فتكون سميكة وتتكون من بروتين سكري وكما أوضح الفحص المجهرى أن كيس البيض يحتوي على جسم ثمالي (Residential body) الذي يتكون من اجسام كبيرة دهنية و رايبوسومات والعديد من حبيبات Amylopectin (Gabriel,2010).

وبالإمكان تميز نوعين من اكياس البيض اعتماداً على سمك الجدار:

- أ- الاكياس سميكة الجدار : Thick wall oocyst تتميز بانها مقاومة للظروف البيئية و تشكل نسبة 80% من اكياس البيض المطروحة مع البراز وتسبب للمضائف الإصابة الحادة.
- ب - الاكياس رقيقة الجدار: Thin wall oocyst تسبب الإصابة الذاتية في الامعاء وتشكل نسبة 20% من اكياس البيض المطروحة مع البراز ( Pollok *et al.*,2003) شكل (1-2).



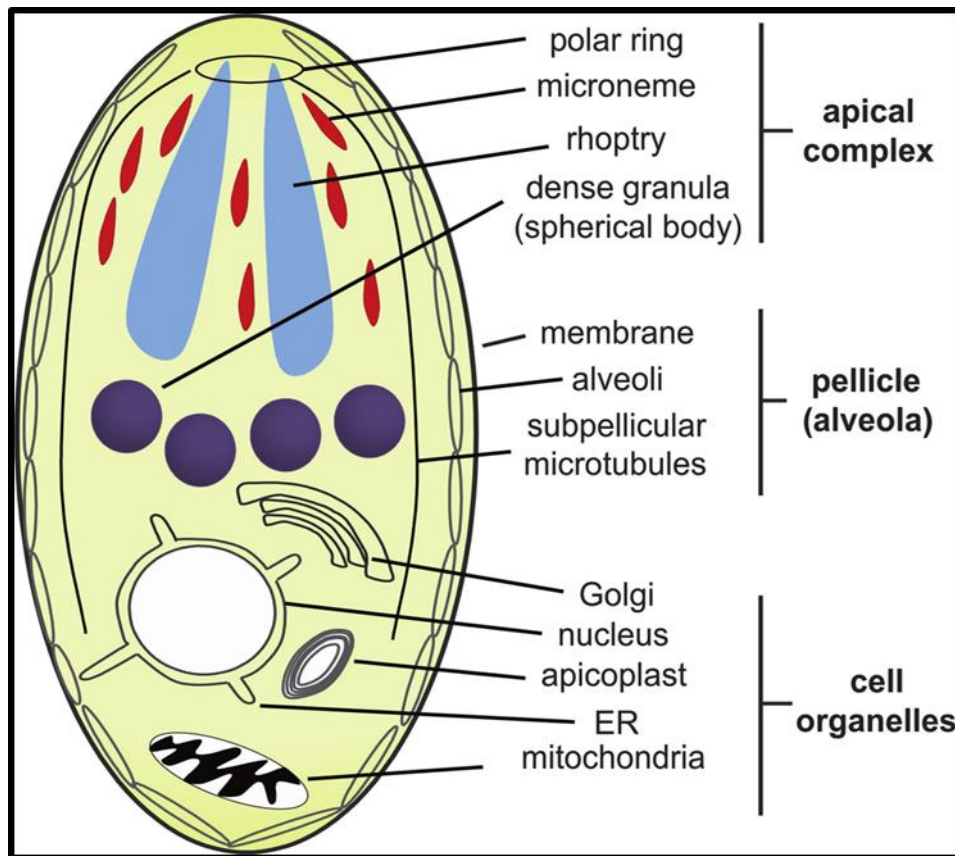
شكل 1-2: كيس البيض لطيفلي الأبواغ الخبيثة (Morgan- Ryan *et al.*, 2002).

### 2.3.2: البويغات Sporozoites

تكون بشكل خلايا محدبة متطاولة ثلاثية الجدار وحجمها  $1.3 \times 0.2$  مايكرو متر وتحتوي على نواة خلفية الموقع وتكون البويغات عديمة الاهداب والاسواط وذات حركة زاحفة تموجية Creeping undulating movement وتحتوي على الشبكة الأندوبلازمية وجسيمات كولجي وعضيات ومايتوكوندريا وحببيبات كثيفة (Vandepitte *et al.*, 1985). أستطاع (Coombs 1997) *et al.* من خلال أبحاثه أن يبين أن البويغات تحتوي على تراكيب تسمى المعقد القمي (Apical complex) الذي يقع في مقدمة البويغ ويتكون من حلقات قمية وعضيات غزو خلايا المضيف التي عن طريقها يتم إفراز مواد تساعد في اختراق خلية المضيف.

### 3.3.2: الطور الخصري Trophozoite

يكون في هذه المرحلة حجم الطفيلي متغير ويتراوح من 2-6 مايكرومتر ويتميز بكونه محاطاً بخمسة أغشية ما عدا منطقة الاتصال بخلية المضيف التي تتكون من حزمة من الساييتوبلازم وعضيات تغذية والتي توجد اسفل فجوة الطفيلي و تنتقل المواد الغذائية عن طريقها الى الطفيلي من الخلية المصابة و تحتوي على عدة أنوية صغيرة و نواة كبيرة كما يتميز بوجود هالة تحيط الطفيلي تدعى الفجوة الحاملة للطفيلي (putingnani *et al.*, 2009) وكما موضح بالشكل (2-2).



شكل 2-2 : الطور الخصري لطفيليات معقدات القمة ( Florin-Christensen & Schnittger, 2018).

### 4.3.2: المفلوقات Schizonts

تتكون هذه المرحلة من 4- 8 اقسومات (Merozoites) نتيجة لانقسام نواة الطور الخضري وتظهر بشكل أجسام محاطة بغلاف رقيق ثنائي ذات شكل هلالى ووجد أن حجم الأقسومة الواحدة يبلغ  $4.3 \times 4.8$  مايكرو متر في الجيل الأول و  $3.6 \times 3.9$  في الجيل الثاني (Goodwin,1989).

### 5.3.2: الخلايا المشيجية الانثوية Macrogametes

تكون بشكل خلايا بيضوية الى كروية الشكل تحتوي على نواة كبيرة وواضحة ذات موقع محيطي وبداخلها النوية ويبلغ حجم هذه الخلايا  $5.1 \times 5.2$  ميكرومتر و تتميز باحتوائها على الشحوم المفسفرة و السكريات المتعددة (عبادة ، 2015).

### 6.3.2: الخلايا المشيجية الذكرية Microgametes

تكون بشكل خلايا عصوية الشكل و لا تحتوى على أسواط و مايتوكوندريا يتراوح حجمها  $3.8 - 3.9$  مايكرو متر وتتميز بأنها تحتوي على اجسام مركزية في مرحلة البلوغ وأمشاج ذكرية صغيرة متحركة (عبادة ، 2015).

### 7.3.2: البيضة المخصبة Zygote

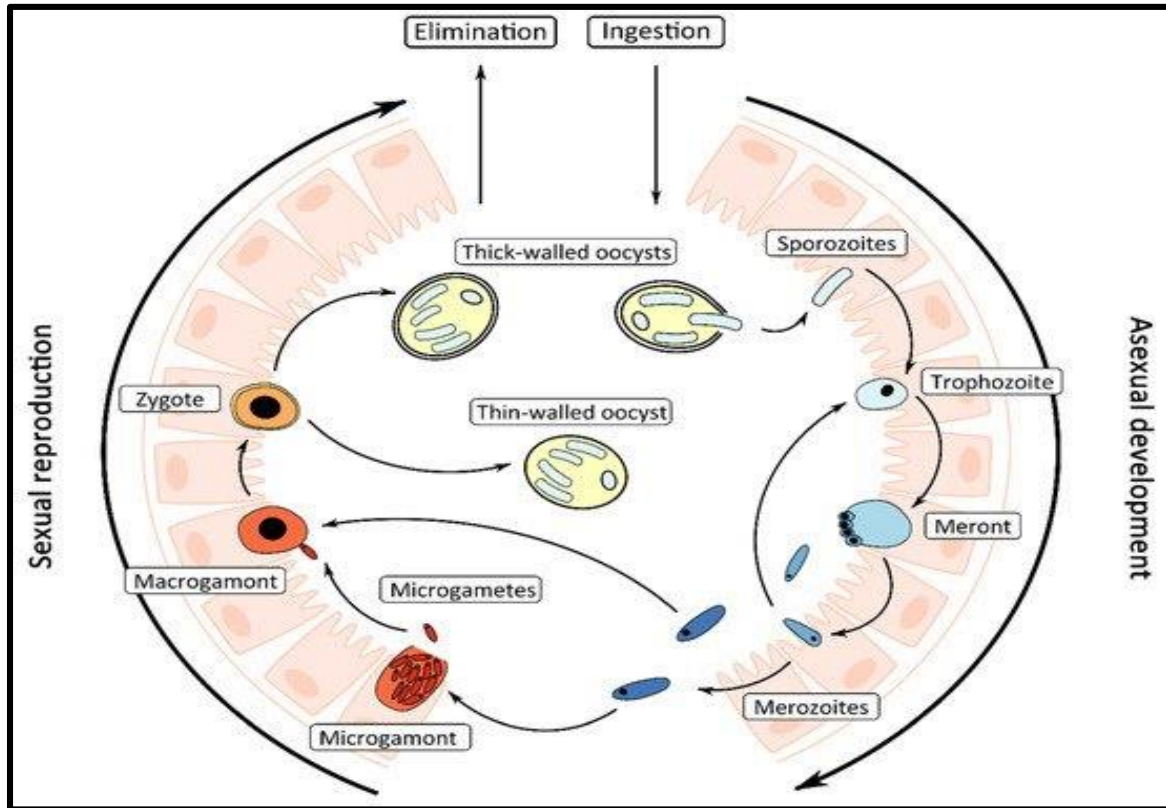
عبارة عن خلية يتراوح حجمها من 4-6 مايكرو متر وتنتج من تخصيب المشيج الذكرى للمشيج الانثوي (الكعبي، 2006).

### 4.2: دورة الحياة Life cycle

تكون دورة الحياة معقدة وتحصل في مضيف واحد (Monoxeous life cycle) وتشمل كلاً من المراحل الجنسية واللاجنسية و يستطيع الطفيلي إكمال دورة حياته داخل جسم المضيف من 48- 72 ساعة وتقسم دورة الحياة الى 6 مراحل نمو رئيسية (Current & Garcia,1991) وهي خروج الأبواغ بعملية تسمى الخروج أو الأنطلاق من كيس البيض ، التكاثر اللاجنسي داخل الخلايا (Merogony) ، التكاثر الجنسي داخل الخلايا (Gametogony) ، تكوين الامشاج التي تشمل الأمشاج الذكرية والأمشاج الأنثوية ، الاخصاب (Fertilization) ، تكوين جدار كيس البيض (Oocyst wall formation) لإنتاج المرحلة المقاومة للبيئة والمسؤولة عن انتقال الاصابة من مضيف إلى اخر، والمرحلة الأخيرة التبوغ وتكوين الأبواغ (Sporogony) لتكوين البويغات المعدية (Thompson *et al.*,2016).

تبدأ دورة حياة الطفيلي عند ابتلاع أكياس البيض من قبل المضيف عن طريق شرب المياه أو تناول الغذاء الملوث بهذه الأكياس أو عن طريق الحيوانات أو الأشخاص المصابين وبعدها يفتح كيس البيض وتحرر أربعة أبواغ بعملية الخروج من الكيس بمساعدة أملاح الصفراء (Bile salts) وقسم من

أنزيمات البنكرياس (Pancreatic enzymes) ، وقد أكد Cerallos *et al.* (2000) أن هذه الأبواغ تنتج بروتين سكري (Cerebellar soluble lectin) الذي يساعد الأبواغ على الألتصاق بالبطانة الظهارية المعوية للمضيف، وبعدها تخترق البويضات الحافة الفرشائية للخلايا الطلائية (Epithelial brush border) التي تبطن أمعاء المضيف مكونة الفجوة الحاملة للطفيلي قرب خلايا المضيف في منطقة الزغابات الدقيقة وبعدها تتحول البويضات داخل هذه الفجوة الى الطور الخضري الذي يكون ذات شكل كروي ثم يخضع الطور الخضري في منطقه الغشاء المخاطي للامعاء الدقيقة للانقسام اللاجنسي لتشكل الجيل الأول من المفلوقات أو مايعرف بأقسومات الجيل الأول (Type1) التي تكون بشكل ست الى ثمان اقسومات شبيه بعناقيد العنب وهذا مايعرف بالدورة اللاجنسية (Thompson *et al.*, 2005)، وبعدها تقوم أقسومات الجيل الأول بمهاجمة خلايا أخرى مجاورة لتشكل الجيل الثاني من المفلوقات أو أقسومات الجيل الثاني (Type2) والتي تكون بشكل أربع أقسومات (Dubey,1993)، ثم تقوم أقسومات الجيل الثاني بمهاجمة خلايا معوية أخرى لتكوين الأمشاج الذكرية والأمشاج الأنثوية لتبدأ مرحلة التكاثر الجنسي إذ يتم تلقيح الأمشاج الأنثوية بواسطة الأمشاج الذكرية لتكوين البيضة المخصبة وبعدها تتطور معظم أكياس البيض الملقحة التي تتشكل بعد عملية الاخصاب اما إلى أكياس بيضية رقيقة الجدران تكون مسؤولة عن الاصابة الذاتية أو إلى أكياس ذات جدران سميكة التي تطرح مع البراز الى البيئة (Thompson, 2005; Current & Garcia 1991). إن ملخص دورة حياة طفيلي الأبواغ الخبيثة موضح في الشكل (2-3).



شكل 2-3 : دورة حياة طفيلي الأبواغ الخبيثة (Gunasekera *et al.*, 2020)

## 5.2: خصوصية المضيف من الطفيلي Host specificity of the parasite

يعد داء الأبواغ الخبيثة من الأمراض المنتشرة بشكل كبير وموثق في أكثر من 1000 تقرير كما بينت الدراسة الوبائية لأكثر من 22000 رضيع وطفل في افريقيا واسيا، إن طفيلي الأبواغ الخبيثة هو واحد من الطفيليات الرئيسية المسؤولة عن معظم حالات الأسهال الحاد في كل أنحاء العالم (Kotloff *et al.*, 2013). وبشكل عام هناك ثلاثة عوامل تساهم بشكل كبير في نجاح طفيلي الأبواغ الخبيثة في إصابة المضيف منها العمر والبيئة و الحالة المناعية المضيف إذ يطرح المصاب أعداد كبيرة من أكياس البيض في البيئة وتكون أكياس البيض شديدة التحمل للظروف البيئية المختلفة وكذلك يمكن أن تعيش عدة أشهر في درجات الحرارة والظروف الرطبة كما إن كيس بيض واحد من الطفيلي يمكنه أن يصيب المضيف (Chappell *et al.*, 2006). وكجزء من دورة الحياة ينتج طفيلي الأبواغ الخبيثة اعداد كبيرة جداً من أكياس البيض وتطرح مع براز الحيوانات والبشر المصابين مما يزيد من التلوث البيئي كما أوضحت الدراسات أن الحيوانات الزراعية وخاصة الماشية تعد مصدراً للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة (Fayer *et al.*, 2010).

يمكن ان تصاب مجموعة كبيرة من الحيوانات المضيفة وتطرح أكياس البيض في برازها بما في ذلك الحيوانات الأليفة والحيوانات البرية المختلفة والبشر (Fayer *et al.*, 2010). ونظراً لوجود مجموعة كبيرة من المضائف لطفيلي الأبواغ الخبيثة لذا أصبح العديد من المصادر البرازية مصدر للتلوث البيئي بما في ذلك تصريفات معالجة مياه الصرف الصحي والجريان السطحي من الاراضي الزراعية بعد استخدام السماد الطبيعي والوصول المباشر للحيوانات الاليفة والبرية إلى مصادر المياه (Rimhanen-Finne, 2006). إذ وجد ان العديد من انواع هذا الطفيلي تتكيف مع المضيف مما يعني انها تصيب على وجة التحديد أنواعاً معينة من الحيوانات أكثر من غيرها على سبيل المثال يرتبط *C. andersoni* بشكل شائع بالماشية بعد الفطام بينما يصيب *C. baileyi* الطيور في الغالب كما وجد أن هناك نوعين من طفيليات الأبواغ الخبيثة مسئولين بشكل اساسي عن العدوى البشرية وهما كلا من *C. hominis* و *C. parvum* ويعد النوع الثاني اقل تكيف مع المضيف (Leoni *et al.*, 2006). وقد أستطاع (Santin *et al.*, 2008) أن يؤكد أن طفيلي الأبواغ الخبيثة أكثر تكيفاً مع المضيف و يمكن أن يصيب مجموعة من الحيوانات بما في ذلك البشر والماشية وأن معظم خفيات الأبواغ لديها بعض الخصوصية للمضيف ولكنها ليست مضيفة محددة بشكل صارم على سبيل المثال *C. Parvum* الأكثر تحديداً للمضيف وقد تم تحديده في الفئران والماشية والبشر والخيول والعديد من مضيفات الثدييات الاخرى. وقد تم العثور على أنواع اخرى بما في ذلك *baileyi*. *C. meleagridis*, *C. fekis*, *C. anis*, و *C. muris* التي كان يعتقد انها مضيفة خاصة بالدجاج والكلاب والقطط والديك الرومي والفئران الا أنه تبين أنها تصيب ايضا البشر وبالتالي يجب اعتبارها

حيوانية المصدر (Caccio et al ., 2002). يوضح الجدول ( 1-2 ) عدداً من من أنواع الطفيلي ومضائفاها فضلاً عن موقع الإصابة. جدول 1-2: بعض أنواع طفيلي الأبواغ الخبيثة والمضائف التي تصيبها وموقع الإصابة التي تواجد فيها (Mehlhorn ,2016).

موقع الإصابة	المضيف	الأنواع
الأمعاء الدقيقة	الأنسان والقرود	<i>C. hominis</i>
الأمعاء الدقيقة	الأنسان ، الماشية ، الماعز ، الأغنام	<i>C. parvum</i>
الأمعاء الدقيقة	الأنسان والخنازير	<i>C. suis</i>
الأمعاء الدقيقة	الأنسان ، الثعالب ، الكلاب	<i>C. canis</i>
الأمعاء الدقيقة	الأنسان ، الماشية ، القطط	<i>C. felis</i>
الأمعاء	الأنسان ، الطيور	<i>C. meleagridis</i>
الأمعاء الدقيقة	الماشية ، الأغنام	<i>C. bovis</i>
القصبات الهوائية	الدجاج ، بعض الطيور	<i>C. baileyi</i>
المعدة	الدجاج ، بعض الطيور	<i>C. galli</i>
المعدة	الأفاعي	<i>C. serpentis</i>
المعدة	القوارض	<i>C. muris</i>
المعدة	أسماك المياه المالحة	<i>C. molnari</i>
المعدة والأمعاء	الأسماك	<i>C. nasorum</i>
المعدة	القوارض	<i>C. proliferans</i>
الأمعاء الدقيقة	الأنسان والقوارض	<i>C. tyzzeri</i>
المعدة	الزواحف	<i>C. serpentis</i>

## 6.2: نمط الانتقال Mode of transmission

### 1.6.2: الغذاء والماء Food and water

ينتقل داء خفيات الأبواغ عن طريق شرب المياه أو تناول الأطعمة الملوثة بأكياس البيض (Ali *et al.*, 2014 ; Mallah & Jomah 2015). إذ بينت بعض الدراسات أن معظم حالات تفشي المرض في جميع انحاء العالم تنتقل عن طريق مياه الشرب الملوثة بأكياس البيض (Goldman & Schafer, 2015; Leav *et al.*, 2003). إذ تتلوث مياه المصدر بسهولة عن طريق جريان المياه في المزارع و مناطق الرعي وتعد مياه الصرف الصحي و محطات المعالجة أو تواجد السماد الطبيعي على الاراضي الزراعية المصادر الرئيسية لتلوث نظام المياه (Rimhanen-Finne, 2006). كما تتزايد تراكيز أكياس البيض في الاوقات الممطرة في السنة واطهرت دراسة اجريت في الولايات المتحدة ان 24-100% من المياه السطحية يمكن أن تحتوي على اعداد قابلة للاكتشاف من أكياس البيض، إذ تم تسجيل ان الإصابة المنقولة بالغذاء يمكن ان تنتقل عن طريق شرب العصير الطازج والحليب الخام وايضا من خلال تناول الطعام غير المطبوخ جيدا والمخزون (Rahi & Raheem , 2012).

### 2.6.2: من حيوان الى انسان Animal-to-human

يصاب المتعاملون مع الحيوانات والمزارعون وزوار المزارع وزوار حدائق الحيوانات الأليفة بشكل مباشر بهذا المرض الحيواني عن طريق ملامسة الأكياس البيضية في براز الحيوانات (Lewis & Harvey , 2016).

### 3.6.2: الاتصال الشخصي Person-to-person contact

يمكن أن تحدث الإصابة في البشر من خلال الاتصال المباشر مع إمكانية انتقال الإصابة من البشر (Kjos *et al.*, 2005). في حين أن الأيدي الملوثة هي وسيلة شائعة لنقل طفيلي الأبواغ الخبيثة من المصابين إلى أشخاص آخرين (Cacciò & Widmer, 2014). يمكن أن تحدث الإصابة حالات ثانوية بين أفراد الغرفة الواحدة والأطفال والموظفين في دور الحضانة والمراكز الصحية والعاملين في الرعاية الصحية للمدارس ومستخدمي حمامات السباحة المشتركة والمسافرين (Bruce *et al.*, 2000).

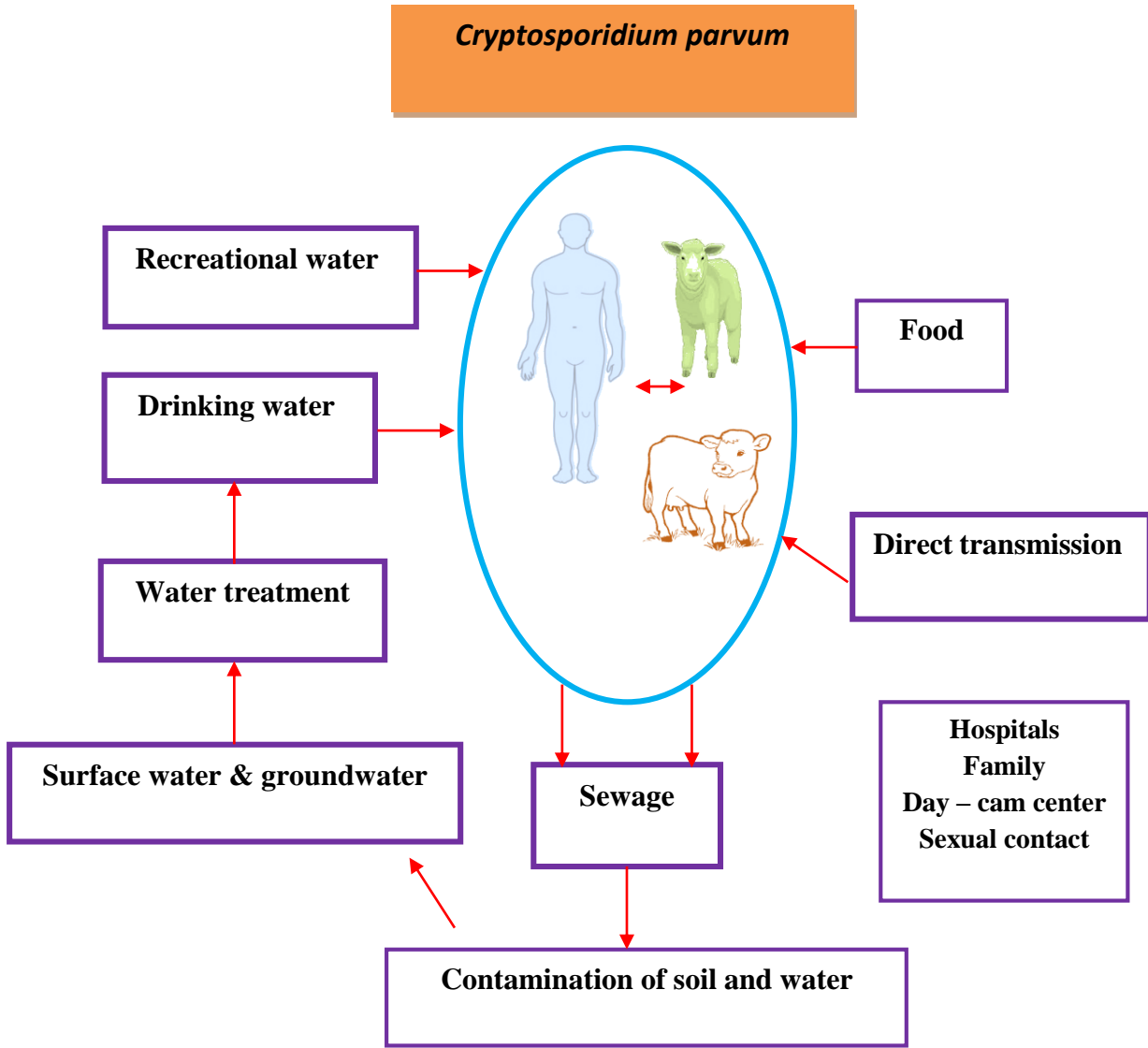
### 4.6.2: المحمولة بالهواء Airborne

تتميز أكياس بيض طفيلي الأبواغ الخبيثة بصغر حجمها مما يجعلها خفيفة بدرجة كافية ليتم نقلها بواسطة الرياح الأمر الذي يسهل انتقال الإصابة عبر الهواء إذ تحدث الإصابة عن طريق استنشاق الهواء المحمل بأكياس البيض (King *et al.*, 2015)، فقد أستطاع الباحثين في عام 1987 أن



يضعوا تصوراً يوضح مفهوم الانتقال المحمول بالهواء عن طريق العديد من النتائج المستمدة من الدراسات الوبائية والبحوث والتقارير والتي تنص على أن طفيليات الأبواغ الخبيثة يمكن أن تنتقل عن طريق إفرازات الجهاز التنفسي من الشخص المصاب فضلاً عن طرائق الانتقال الأخرى (Florescu & Sandkovsky,2016) . إذ يتم انتقال أكياس بيض الطفيلي عن طريق استنشاق الرذاذ المتطاير أو عن طريق ملامسة الأبخرة الملوثة بالسعال وقد وفر الكشف عن داء الأبواغ الخبيثة التنفسي أدلة ضرورية لوضع إرشادات إضافية للوقاية منه (Sponseller et al. , 2014).

ولا يقتصر أنتشار طفيلي الأبواغ الخبيثة على طرائق الانتقال المذكورة سابقاً وإنما هناك طرائق أخرى لانتقال أكياس البيض، فقد أكد (Al-Habsi et al., 2017) إمكانية انتقال أكياس البيض عن طريق تلوث التربة ولاسيما التربة الطينية الملوثة بالبراز إذ يمكن أن تبقى أكياس البيض داخل التربة لمدة تصل الى 70 يوماً ومن ثم الى المياه السطحية والأغذية. وكذلك يمكن أن تنتقل أكياس البيض بصورة عرضية عن طريق الطيور المهاجرة الى مناطق واسعة من العالم كما في الأوز الكندي (*Branta canadensis*) الذي يكون بمثابة ناقل عرضي لأكياس البيض المعدية للإنسان بما في ذلك النوعين الشائعين *C. parvum* , *C. hominis* وبذلك تساهم في انتقال المرض من الحيوان إلى الإنسان (Ryan, 2010)، وقد أظهرت العديد من الدراسات أن أنواعاً من الرخويات في المياه العذبة والبحرية مثل المحار يمكن أن تبتلع وتحمل أكياس بيض طفيلي الأبواغ الخبيثة & Downey (2007) ; Graczyk, 2008 ; Lucy et al., 2008)، كذلك يعد الذباب ناقلاً ميكانيكياً لأكياس بيض الطفيلي وبسبب طبيعة معيشتها على القمامة والمراحيض ومياه الصرف الصحي والمذابح فهي بذلك تعد إحدى العوامل الوبائية لانتقال المرض (Conn et al., 2007)، كما تم العثور على أكياس بيض الطفيلي في المسالك المعوية للصرصر الأمريكي (*Periplaneta americana*) مما يشير إلى أن الصرصر لها دور في نشر الطفيلي (Al-Warid et al.,2010)، كما تستطيع الخنافس ان تنقل أكياس بيض الطفيلي في المسالك المعدية والمعوية وبذلك تشارك في وبائية الطفيلي (Graczyk et al., 2005) وكما موضح بالشكل (2-4).



شكل 2-4: الطرائق الرئيسية للإصابة بطفيلي الأبوغ الخبيثة (Cacciò & Widmer, 2014)

## 7.2: العوامل المؤثرة في كثافة وانتشار الطفيلي

### Factors influencing the intensity and spread of Parasite.

#### 1.7.2: العوامل المتعلقة بتكاثر الطفيلي

#### Factors related to parasite proliferation

أوضحت الدراسات ان طفيلي الأبوغ الخبيثة مصدر رئيسي للإصابة بالإسهال عند الإنسان في جميع انحاء العالم، وتتميز أكياس بيض الطفيلي بقدرتها على تحمل الظروف البيئية ومقاومتها للمعقات والمطهرات لذلك يجب التخلص من هذه الأكياس للحد من انتشار هذا الطفيلي عن طريق استعمال المعالجات الميكانيكية والكيميائية لإزالة أكياس البيض من الماء قبل الاستهلاك البشري وان هذه المعالجات تتمثل في إزالة أكياس البيض عن طريق الترشيح من خلال مجموعة كبيرة ومتنوعة من المرشحات الدقيقة التي تعمل على التخلص من هذه الأكياس في منافذ المياه النظيفة. اذ وجد ان

هز خليط من أكياس بيض الطفيلي مع جزيئات الرمل يمكن ان يؤدي الى تدمير هذه الأكياس لاسيما بعد اضافة الكلور، إذ أن عملية خلط أكياس البيض بالرمل لمدة 5 دقائق ثم الكلورة لمدة 5 دقائق إضافية يؤدي الى تعطيل 68.02% من فعالية هذه الأكياس ويمكن تطبيق هذه العملية على منشأة تنقية المياه الكبيرة مما يقلل من العمليات باهظة الثمن المستخدمة اليوم للتخلص من هذا الطفيلي (Parker & Smith, 1993)، تم تحديد توقيت وشدة القمم الموسمية لحدوث الإصابة بالطفيلي وفحص التزامن في توقيت هذه القمم فيما يتعلق بدرجة الحرارة لمدة 10 سنوات ونسبة حدوثه عند درجة حرارة الذروة المسجلة (27-30م) (Naumova et al., 2007). إذ أظهر الطفيلي تأخيراً كبيراً في تسجيل ظهوره يصل الى 40 يوم تقريباً ويفسر هذا التأخير طبقاً لما أوضحه الباحث (Casman et al., 2001) بسبب طرق الانتقال المختلفة (Various modes of transportation)، تضخيم العدوى من شخص لأخر (Magnify the infection from one person to another)، البقاء البيئي للعوامل الممرضة (Environmental survival of pathogens) ووقت الحضانة (Incubation time).

تعد التغيرات المناخية ذات تأثيراً كبيراً على أنتشار الطفيلي إذ بينت الدراسات أن زيادة درجة الحرارة والتغيرات في تدفق الأنهار وارتفاع تلوث المياه يمكن أن تزيد من الإصابة (Charron et al., 2004). من الواضح أن مواسم الامطار هي عامل رئيس في انتشار الطفيلي، إذ هناك أدلة متزايدة تشير على أن الطقس غالباً ما يكون عاملاً مهماً في إحداث الأمراض المنقولة بالمياه. ووجدت دراسة حديثة أن لهطول الأمطار تأثير كبير على الأمراض المنقولة بالمياه في الولايات المتحدة وأن أكثر من نصف تفشي الأمراض المنقولة بالمياه في الولايات المتحدة أعقب فترة هطول الأمطار (Curriero et al., 2001; Charron et al., 2004).

### 2.7.2: العوامل المتعلقة بالمضيف Factors related to host

وجد أن هناك أكثر من 19 نوع من المضائف صالحة لطفيليات الأبواغ الخبيثة هناك 13 نوع من الثدييات المصابة وثلاثة طيور و اثنين من الزواحف ونوع واحد من البرمائيات وتتطلب هذه المضائف بيانات مورفولوجية وبيانات وراثية كافية (Fayer, 2010). أشار (Xiao & Ryan 2008) ان هناك درجة معينة من تكيف المضيف واضحة ولا يبدو ان انواع الطفيلي التي تصيب الزواحف والبرمائيات والاسماك تصيب الثدييات والطيور اما أنواع الطفيلي التي تصيب الثدييات فتظهر بعضها درجة من التكيف للمضيف. أظهرت التحاليل للحالات البشرية في جميع انحاء العالم ان *C. parvum* و *C. hominis* يمثلان أكثر من 90% من الاصابة على الرغم من اختلاف توزيعهما جغرافياً واجتماعياً واقتصادياً وقد تكون نسبة الانواع او الانماط الجينية الاخرى الموجودة اعلى في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة وأوضاع اجتماعية واقتصادية محددة (Xiao & Ryan 2008). إذ اكدت التحاليل المختبرية التي رصدت حالات الإصابة استناداً على الحالات البشرية المؤكدة أن

معظم الحالات كانت بين الاطفال الصغار ولكن تتأثر جميع الاعمار واوضحت التقارير أن ذروة المرض ظهرت في الربيع واوائل الخريف ويعد *C. parvum* و *C. hominins* أكثر من 96% من الحالات في المملكة المتحدة ولهما توزيع موسمي اذ يسود *C. parvum* في النصف الأول من العام و *C. hominis* في النصف الثاني (Chalmers & Pollock , 2008). يعد *C. parvum* من العوامل الرئيسية المسببة للإسهال (Defra , 2008 ; Brook et al.,2009) وتصل تقديرات أنتشار الطفيلي في المواشي التي يقل عمرها عن 3 اشهر الى 100% كما أن هناك عدد كبير من أكياس البيض المتساقطة حتى من قبل الحيوانات التي تبدو سليمة تشكل تهديد كبير للتلوث البيئي و انتقال الإصابة للبشر (Brook et al., 2008 ; 2009).

### 3.7.2: العوامل المتعلقة بالبيئة Factors related to environment

يعد داء خفيات الأبواغ مرض منتشر بشكل كبير في البشر وخاصة عند الأطفال والأشخاص المنقوصي المناعة (Fayer, 2004 ; Nuñez et al., 2003). وتشير البيانات الحديثة إن متوسط الانتشار العام للإصابة في المرضى ذوي الكفاءة المناعية في البلدان النامية هو 12,7% في المصابين بالإسهال ووجد أن 9.5 % يحملون الطفيلي بدون ظهور اعراض المرض (Bushen et al., 2006). إذ ان عوامل خطر انتشار داء خفيات الأبواغ معروفة جيداً في البلدان الصناعية إذ تتزايد أكياس البيض التي تنقلها مياه الشرب الملوثة أو المياه الترفيهية (Fayer , 2004). واستناداً الى العديد من الدراسات فان عوامل الخطر لداء خفيات الأبواغ البشرية هي الاتصال بالأشخاص المصابين بالمرض عن طريق السفر إلى الخارج أو الاتصال بالماشية وقد تكون عوامل الخطر لاكتساب الإصابة مرتبطة بالبيئة (Hunter & Thompson 2005). إذ اجريت دراسة وبائية لتحليل عامل الخطر للإصابة *C. parvum* و *C. hominins* كان الأول مرتبطاً بالسفر الى الخارج والثاني مرتبط بالاتصال بالماشية (Hunter et al., 2004). واستطاع (2002) Bern et al. أن يوضح أن عوامل الخطر البيئية وطرائق انتقال الإصابة ليست محددة بشكل جيد على الرغم من دراسات المراقبة العديدة التي تم الإبلاغ عنها إذ تم إجراء عدد من التحقيقات حول مصدر الإصابة لمجتمع تتوطن فيه الإصابة وجد أن تلوث إمدادات المياه وإصابة الحيوانات الأليفة في الأحياء الفقيرة البرازيلية (Newman et al., 1993). وكذلك نقص المياه البلدية وخدمات الصرف الصحي الملائمة في ثلاثة أماكن مكسيكية (Redlinger et al., 2002). والتبرز في البيئة الخارجية بدلاً من المرافق الصحية في المجتمعات الريفية في جنوب أمريكا (Bern et al., 2002).

## 8.2 : الامراضية Pathogenesis

تعد أكياس البيض السبب الرئيس للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة في جميع المضائف (Khalafet et al., 2015 ; Girones et al., 2010). تبدأ الإصابة بالطفيلي عندما تنطلق البويضات من أكياس البيض المبتلعة ، والتي تلتصق لاحقاً بالخلية الظهارية المعوية وتغزوها (Hunter & Nichols,2002). تختلف شدة الإصابة في الانسان بين المعتدلة والحادة وتعتمد شدة الإصابة على الحالة المناعية والتغذوية للمضيف بالإضافة الى موقع الإصابة والمقاومة الطبيعية للمضيف ومدى قدرة الطفيلي على الغزو والاستيطان وأفراس السموم المعوية (Enterotoxines)، فضلاً عن البيئة المناسبة لنمو الطفيلي، وتتباين درجة الإصابة في امعاء الانسان إذ وجد أن منتصف الامعاء الدقيقة أكثر تأثراً من القولون والمستقيم بينما تكون المعدة قليلة التأثير (Liu et al.,2014). كما بينت الدراسات أن نوع *C.parvum* يمتلك ضراوة أكثر من الطفيليات البوغية الأخرى لاحتوائه على جينات منتجة للسموم ، أذ وجد أنها في المجترات تطرح عدد قليل من أكياس البيض مع البراز يصل الى 500 كيس بيض مع ظهور علامات سريرية ملحوظة بالمقارنة مع نوع *C. muris* الذي وجد أن المضيف يطرح عدد كبير من أكياس البيض يصل الى مليون كيس بيض مع غياب العلامات السريرية (Clark,2005 ; Chalmers & Davies,2010). كما بينت بعض الدراسات أن بويضات الطفيلي تلتصق بخلايا المضيف اعتماداً على بعض العوامل بما في ذلك دورة الخلية المضيفة والجرعة والايون ودرجة الحموضة (Snelling et al., 2007). كما أوضح الباحث (Smith et al. (2005) ان الطفيلي يحتوي على العديد من البروتينات السكرية سطحية الموقع التي قد تلعب دوراً في التعلق بخلايا المضيف ومن هذه البروتينات السكرية GP900 و Gp400 فضلاً عن البروتينات السكرية المحيطة (CSL) التي تلعب دوراً في التعلق وغزو الخلايا وقد يلعب GP 900 دوراً في مقاومة الطفيلي لتحلل البروتين بواسطة العديد من البروتينات الموجودة في امعاء الثدييات . بينت دراسة أخرى ان المعقد القمي للطفيلي الذي يتم دمج مع الحلقة القمية والعضيات المخروطية و الإفرازية تشارك بصورة رئيسة في عملية الالتصاق وغزو الخلايا المضيفة (Borowski et al., 2008).

يقوم الطفيلي بغزو الزغابات المعوية (Microvilli) بعد عملية التعلق مما يؤدي الى حدوث تغيرات نسجية في الشكل الطبيعي للزغابات إذ يصبح شكلها قصير ومستدير وبالتالي تقل سعة الأمتصاص ومن ثم زيادة الأفراس، وكذلك يتغير شكل الخلايا الطلائية العمودي الطويل الى الشكل الأسطواني القصير أو المكعب ومن ثم تؤدي الى ضمور أو تحطيم الزغابات Atrophy (Topuchain et al., 2003) أن فقدان الزغابات لوظيفتها يؤدي الى حدوث تغيرات ألتهاوية كأرتشاح خلايا البلازما والخلايا اللمفاوية وبالتالي تؤدي هذه التغيرات الى حدوث اضطرابات هضمية وسوء أمتصاص وتغيرات في تدفق السوائل واسهال ، كما وجد أن الطفيلي يصيب الطبقة المخاطية

وبذلك يكون الاسهال ذات لون أخضر أو أصفر مع عدم وظهور دم في البراز (Casemore *et al.*, 1985).

وقد أستطاع (Richard *et al.*, 1996) أن يبين أن الطفيلي يفرز سموماً خلوية (Cytotoxic) لها القدرة على تحلل البروتين (Proteolytic) مما يؤدي الى تلف الطبقة المخاطية الخارجية للأمعاء مما يقلل من عملية الامتصاص وبالتالي ينتج الإسهال (Lean *et al.*, 2002). كما وجد أن الطفيلي يؤدي الى حدوث تغيرات ملحوظة في المحتوى الكيميائي للأمعاء بالإضافة الى التغيرات البيوكيميائية وخاصة في نشاط أنزيم Myeloperoxidase(MPO) المتوفر بكميات كبيرة في الوحيدات Monocyte والعدلات Neutrophil التي تلعب دوراً كبيراً في مناعة الجسم، أذ وجد أن هذا الانزيم يعمل على زيادة فعالية الخلايا السمية لقتل الاحياء المجهرية بما في ذلك الطفيليات المعوية ، كما وجد أن زيادة مستوى MPO مؤشر على التهاب المعدة والأمعاء (Khan *et al.*, 2004).

كما أن للحركات الخلوية البائدة للالتهاب Pro-inflammatory cytokines دور في تحفيز خلايا الدم البيض في إنتاج Prostaglandin (PGE) الذي يحفز الافرازات المعوية ويثبط أمتصاص كلوريد الصوديوم (NaCl) مما يؤدي الى حدوث خلل في التوازن الأمتصاصي ومن ثم حدوث الاسهال (Argenzio *et al.*, 1993) ، وكما لوحظ أن التصاق الطفيلي في الأغشية المخاطية للأمعاء يؤثر على الفعاليات الايضية ويؤدي الى فقدان أنزيم اللاكتيز Lactase الذي يفرز من قبل خلايا الأمعاء ويعمل على تحويل السكر الثنائي الى سكر أحادي مما يؤدي الى تراكم السكر اللاكتوز الثنائي في تجويف الأمعاء وهذا يؤدي الى تغيرات تناضحية فيسحب الماء من الدم والأنسجة المحيطة الى تجويف الأمعاء مما يؤدي الى حدوث أسهال (Bonnin, 1999).

## 9.2: داء الأبواغ الخبيثة Cryptosporidiosis

### 1.9.2: وصف المرض Description of the disease

يحدث المرض نتيجة الإصابة بطفيلي الابواغ الخبيثة وهو مرض طفيلي شائع يسبب الإسهال عند البشر والحيوانات في جميع أنحاء العالم ويمكن أن يحدث في كل من الأفراد ذوي الكفاءة المناعية ، أو في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة ووجد أن الإصابة يمكن أن تكون خطيرة على الأشخاص الحاملين لفيروس نقص المناعة البشرية Human immunodeficiency virus بسبب نقص جهاز المناعة فضلاً عن ذلك قد ترتبط الإصابة الشديدة أيضاً بعدوى فيروس التهاب الكبد Hepatitis B virus في الإنسان (Yang *et al.*, 2017; Wanyiri *et al.*, 2014)، والتي من المحتمل أن تكون مرتبطة أيضاً بجهاز المناعة الضعيف (Ferrari , 2015). يتسبب المرض في خسائر اقتصادية كبيرة في تربية الحيوانات ويهدد النظافة العامة في جميع أنحاء العالم. اذ يمكن أن

يكون الإسهال واسع النطاق وينتج عنه الموت وتعتمد شدة المرض على عدة عوامل مثل العمر والبيئة والأمراض المترافقة والحالة المناعية للمضيف. إذ يموت آلاف الأطفال الذين تقل أعمارهم عن 5 سنوات في جميع أنحاء العالم سنويًا بسبب هذا المرض، يتم تسجيل معظم الحالات المرضية في البلدان الأقل تقدمًا في إفريقيا وآسيا بسبب سوء التغذية وضعف النمو الذي يشيع ظهورهما في هذه المناطق (Mondal *et al.*, 2009 ; Molbak *et al.*,1997)

عادةً ما تتركز الإصابة في الخلايا المعدية والمعوية التي تبطن الأسطح الظهارية للأمعاء الدقيقة والغليظة ، ويوجد نوع من خفيات الأبواغ تشمل أيضًا الأسطح الظهارية للجهاز التنفسي إذ تم العثور الطفيلي في الشعب الهوائية ، وفي الظهارة القصبية في المرضى المعرضين للخطر المناعي (Cacciò & Widmer, 2014). غالباً ما يكون المرض ذو إصابة حادة قصيرة الأمد وفترة الحضانة يمكن أن تتراوح من يوم واحد إلى شهر واحد حسب نوع الطفيلي والحالة المناعية للمضيف (Pereira *et al.*,2002 ; Okhuysen *et al.*, 1999 ) وأن معدل الإصابة بالمرض يزداد بشكل واضح في المناطق الريفية ويرتبط عكسياً مع عمر المصاب ( Abdul – Sada , 2015 ). يعد الاهتمام ببحوث هذا الطفيلي أمراً ضرورياً بعد ان تبين ان هذه الطفيليات يمكن ان يسبب أوبئة من مرض الاسهال عن طريق المياه كما حدث عام 1993 في وباء ميلوكي Milwaukee epidemic الذي أدى الى إصابة اكثر من 400 الف عامل بعد ان استخدموا مصدر واحد لمياه الشرب (Deng *et al.*, 2004).

## 2.9.2: الاعراض والعلامات المرضية Signs & symptoms

تتنوع الاعراض المرضية لداء خفيات الابواغ المعوي بين الاشخاص ذوي الكفاءة المناعية والاشخاص الذين يعانون من نقص المناعة إذ تشمل المظاهر الاولى الاسهال المائي الحاد وذو لون أخضر أو أصفر وله رائحة كريهة ويحتوي على المخاط وهو اكثر الاعراض شيوعاً إذ يستمر لمدة تتراوح من اسبوع الى اسبوعين فضلاً عن الأعراض الأخرى مثل الغثيان والقيء والام البطن وتقلصات المعدة والحمى الخفيفة والصداع ( Mac & Kenzie *et al.*,1994 ). وقد يكون المرض اكثر حدة إذا ظهر بشكل اسهال منهك والشبيهة بالكوليرا وفقدان الشهية والشعور بضيق في التنفس والارهاق و تشنجات البطن الشديدة و حمى وفقدان الوزن وقد وجد عادة ما تؤدي حركات المعدة المتكررة الى فقدان الماء مما يؤدي الى فقدان الوزن والجفاف (Rimhanen-Finne, 2006) (Syeda *et al.*, 2014 ; وقد تستمر الأعراض لمدة تصل الى ثلاثة أسابيع في المرضى الذين يعانون من الأورام الخبيثة أو زرع الأعضاء أو الذين يخضعون للعلاج الكيميائي وقد يؤدي الى فقدان الوزن في حالة الأسهال المزمن (Jokipii ,1986). وجد أن 60% من مرضى الأيدز يموتون بسبب أصابتهم بطفيلي الأبواغ الخبيثة إذ يفقد جسم المصاب يومياً 5 لتر من البراز المائي (Arora ,2009).

وأستطاع ( Davidson ( 2010 أن يؤكد من خلال الدراسات التي قام بها ان شدة المرض تعتمد بشكل اساسي على الاستجابة المناعية للفرد وان أصابة القناة الصفراوية من المضاعفات المتكررة لدى المصابين وانتشار الطفيلي الى القنوات الصفراوية والبنكرياس والكبد مسبباً اليرقان وتصلب الصفراء والتهابها وظهور الحصاة فيها ، فضلاً عن ألتهاب البنكرياس والكبد وكبر حجمهما (Gosif,2004) وأن ظهور الانتفاخ المعوي يحدث بسبب منع الامتصاص والرجفة وعلامات التسمم الغذائي والحساسية (Certad et al.,2007). وتشمل المظاهر السريرية لداء خفيات الأبواغ التنفسي التهاب الغشاء المخاطي للأنف او الجيوب الأنفية او الحنجرة او القصبة الهوائية فضلاً عن افرازات الانف و السعال وضيق التنفس و الحمى وآلام الصدر مع الالتهاب الرئوي وتغير الصوت (Sponseller et al., 2014).

## 10.2: وبائية داء الأبواغ الخبيثة Epidemiology of Cryptosporidiosis

يعد داء خفيات الأبواغ من الأمراض المنتشرة عالمياً واعتماداً على سجلات منظمة الصحة العالمية في عام 2010 تم وصف هذا المرض كأحد أسباب الإسهال الذي يمثل 4.1 % من مجموع الإصابات الدولية المسجلة لأمراض الإسهال والسبب الرئيس لوفاة 1.8 مليون سنوياً (Al-Tufaili et al.,2014) أوضح (Banjo et al.,2013) أن طفيلي الأبواغ الخبيثة يكون سبباً رئيساً لـ 10-20% من حالات الإسهال في المصابين بفيروس نقص المناعة ، وهناك عوامل مهمة عديدة تساعد في أنتشار الإصابة بداء الأبواغ الخبيثة منها أن الطفيلي يستطيع أن يكمل دورة حياته في مضيف واحد مما يؤدي الى سهولة الإصابة (Fayer et al.,2000) وأن أكياس البيض المطروحة البراز تكون كاملة النضج ومقاومة للظروف البيئية والعديد من المعقمات أذ تستطيع أحداث الإصابة مباشرة (Xiao & Cama,2006) ، وسهولة أنتقال المرض من الشخص المصاب الى الشخص السليم أو من حيوان الى أنسان عن طريق أكياس البيض (Muraleedharan,2009) . هناك مجموعة من الأحصائيات التي تشير الى أنتشار الطفيلي على المستوى المحلي والعالمي ، كشفت الدراسة التي أجريت في تركيا تضمنت أنتشار داء خفيات الأبواغ لدى الأشخاص الذين تقل أعمارهم عن 12 عامًا ووجدت أكياس بيض خفية الأبواغ في سبع من الحالات 3.5% (Akyon et al.,1999). وتم تسجيل نسب مختلفة من الإصابة في مصر في فترات مختلفة (16.6% عام 1986 ، 11.6% عام 1987 و 27.9% عام 1996) (Michel et al., 2000) كما أجريت دراسة عام (2001) على 3549 عينة براز من 509 أطفال في الكويت كشفت هذه الدراسة عن وجود الطفيلي في 51 (10 %) حالة إصابة بالإسهال (Mallah & Jomah, 2015).

أجريت في المملكة العربية السعودية دراسة على 13 مدرسة ابتدائية في مكة المكرمة وجدت أن 4% من 589 عينة براز تم جمعها من أطفال المدارس الذين لم تظهر عليهم أعراض والذين تتراوح أعمارهم بين 7 - 12 عامًا ، قد أصيبوا بخفيات الأبواغ (Al-Harthi, 2004). وكذلك أجريت دراسة



في العاصمة الإيرانية بما في ذلك عينات البراز المأخوذة من 104 أطفال ومرضى بالغين مصابين بالتهاب الأمعاء عن وجود 2.9% من الحالات المصابة بخفيات الأبواغ (Nahrevanian *et al.*, 2007). و اشتملت دراسة في محافظة الرمادي على اختبار 115 عينة براز مأخوذة من أطفال مصابين بشدة أظهرت النتائج نسبة الإصابة الإجمالية 39.13% وكانت 26.08% في الريف و 13.4% في المدينة وكانت أعلى معدلات الإصابة عند الأطفال من عمر شهر إلى سنة. (Mohanad, 2008). تمت دراسة انتشار خفيات الأبواغ في شمال بغداد أذ وجد أنه في 737 عينة براز بشرية تم تسجيل معدل إصابة مرتفع 55.04% بين الأطفال دون سن العاشرة مقارنة بالفئات العمرية الأخرى (AL-Warid , 2010). وكما غطت الدراسة في نيجيريا لـ 692 طفلاً وكشفت أن 134 19.4% منهم أصيبوا بخفيات الأبواغ (Molloy *et al.*, 2011). أظهرت نتائج بحث في شمال الهند أن أعلى انتشار لداء خفيات الأبواغ كان في الفترات الممطرة (Desai *et al.*, 2012). ظهر تأثير طفيليات الأبواغ على الأطفال أيضاً في الأردن وليبيا وفلسطين وتونس وتم تسجيل معدلات انتشار من 1 إلى 43% (متوسط 8.7%) في الأطفال المصابين بالإسهال المؤهين مناعياً و 1-82% ومتوسط 41% في الأطفال والبالغين منقوصي المناعة (Ghenghesh *et al.*, 2012). بينما حددت دراسة أخرى أجريت في إندونيسيا 917 مريضاً يعانون من الإسهال الحاد مقسمة إلى مجموعتين (715 مريضاً داخلياً و 202 مريضاً خارجياً) تم اكتشاف الإصابة في 26 عينة 2.8% من المرضى و 15 عينة 1.4% من 1043 مريض (Caccio & Putignani, 2014).

أما في العراق فقد اختلفت الدراسات بتسجيل نسب الإصابة بداء الأبواغ الخبيثة أذ أظهرت نتائج الدراسة التي بحثت في تفشي مرض خفيات الأبواغ في النجف بعد فحص 321 عينة من الاطفال وجدت اصابة بالطفيلي في 35 عينة (10.9%) اصابة الذكور مرتفعة وكانت أعلى من الاناث اذ تبين أن الأطفال في عمر 3-4 سنة هم الأكثر عرضة للإصابة (Hussein, 2012). وفي مدينة الكوت وجود نسبة عالية 33.83% (بين الأطفال دون سن 12 عاماً) (Rahi *et al.*, 2013) بينما فحصت دراسة أخرى أكثر من 100 عينة من البراز التي تم جمعها من الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين شهر واحد و 12 عاماً لـ 30 عينة ، 30% كانت موجبة للطفيلي وأن أعلى معدل إصابة كان عند الرضع (59%) عينة إيجابية وأقل معدل في عمر 7-12% (4%) (Ali *et al.*, 2014) ويمكن أن ترتبط الإصابة وانتشارها مع سلوك النظافة العامة كما تعد عوامل البيئة ومصادر شرب المياه المستخدمة للشرب والطبخ من العوامل التي تزيد من انتشار داء الأبواغ الخبيثة. فضلاً عن وجود بعض الدراسات التي أجريت في مدن عراقية و المدرجة في الجدول (2-2).

جدول 2-2 : بعض الدراسات التي أجريت في بعض المدن العراقية حول الطفيلي.

المصدر	نسبة الإصابة %	المضيف	نوع الدراسة	موقع الدراسة
Mahdi <i>et al.</i> ,1996	18.3%	الأنسان ≥ 5 سنوات	وبائية	البصرة
Al-Gelany,2003	8.03	البالغين	وبائية	جنوب بغداد
	76.25	الأبقار		
	100	الجاموس		
	17.74	الماعز		
	48.8	الأغنام		
	48.54	الحشرات		
	55.5	الأطفال		
Yaqoob <i>et al.</i> ,2004	35.04	العجول	وبائية	بغداد
	12.4	الأنسان	تشخيصية	
Kadir,2004	10	الأطفال ≥ 10 سنوات	وبائية	صلاح الدين
	23.6	الماعز		
	20	صغار الأغنام		
	19.2	العجول		
الكعبي،2006	6.6	الأطفال	وبائية	الديوانية
	27.5	الأغنام		
	16.2	الأبقار		
مخلف،2008	39.13	الأطفال	تشخيصية	الرمادي
معدة ، 2008	6.6	الأنسان	وبائية	بابل
Al-Warid,2010	14.78	الأنسان	وبائية تشخيصية	شمال بغداد
الشباني ، 2014	18.01	الأطفال	وبائية تشخيصية	الديوانية
Al-Baldawy,2017	12.85	الأطفال	تشخيصية	النجف

## 11.2: التشخيص Diagnosis

### 1.11.2: العلامات السريرية Clinical Signes

تتباين شدة العلامات السريرية المرضية للشخص المصاب بطفيلي الأبواغ الخبيثة مع مقدار الضرر الذي يسببه الطفيلي للخلايا الطلائية المعوية ومن أبرز العلامات المرضية هو الإسهال المائي Watery diarrhea ذو اللون الأصفر أو الأخضر مع رائحة كريهة ويحتوي على كمية من المخاط وحمى خفيفة وجفاف مع الام عضلية وتعب وغيثان وفقدان الشهية (Richard *et al.*, 1996)

### 2.11.2: التشخيص المختبري Laboratory Diagnosis

#### 1.2.11.2: الفحص المجهرى المباشر Direct microscopical examination

تعد طريقة الفحص المجهرى الطريقة الاكثر انتشاراً لتشخيص أكياس البيض التي يمكن اجراؤها عن طريق فحص عينات البراز مباشرة على الشرائح الزجاجية وكذلك يمكن تركيز العينات اما عن طريق التعويم او الترسيب لفحص المسحات البرازية بالإضافة الى ميزة التركيز الكثير من أكياس البيض (Fayer & xiao.,2007).

#### 2.2.11.2: طريقة التصبغ Staining method

تعتمد هذه الطريقة المهمة من طرائق الكشف عن طفيلي الأبواغ الخبيثة على الفحص المجهرى بالاشترك مع طرائق التصبغ المختلفة والطريقة الاكثر استخداماً هي طريقة التلوين بأستخدام صبغة زيل نلسن المعدلة (Modified Ziehl-Neelsen) لأكياس البيض والتي تقدر حساسيتها بنسبة 75% (Chalmers *et al.*,2011). إذ بينت الدراسات أن أكياس البيض تظهر تحت المجهر الضوئي بشكل بقعة ذات لون أرجواني مع خلفية زرقاء (Elgun & Koltas, 2011). أستخدمت هذه الطريقة لأول مرة عام 1981 للكشف عن أكياس البيض في البراز ومن المحتمل ان تكون طريقة التصبغ الاكثر استخداماً بسبب بساطتها وتكلفتها المنخفضة على الرغم من انها تظهر حساسية منخفضة في البراز (Nielsen & Word , 1999) نظراً لان احجام أكياس البيض مماثلة لتلك الموجودة في الخمائر وحبوب اللقاح وغيرها من الحيوانات الابتدائية مثل *Cyclospora* لذلك لا يمكن اكتشاف هذه الاكياس بسهولة (Duggal,2013; Jafari *et al.*, 2015).

#### 3.2.11.2: طريقة التركيز Concentration method

تتضمن هذه الطريقة عدة طرائق تشخيصية منها :

أ . **التطويف (Flotation):** بمحلول شيدر السكري أو بالمحلول الملحي المشبع أو باستخدام مادة كبريتات الخارصين (Ma & Soave,1983).

ب. **الترسيب (Sedimentation)** بأستعمال الفورمالين مع الأيثر (Morgan *et al.*, 2000).

### 4.2.11.2: الفحص النسيجي Histological examination

يتم الفحص النسيجي عن طريق تحضير المقاطع النسجية وذلك بأخذ خزعة (Biopsy) من العضو أو النسيج المصاب المراد فحصه للأنسان أو الحيوان وتحفظ في محلول الفورمالين بتركيز 10% ثم تقطع بسماك 5 مايكرومتر وتصبغ بصبغات معينة مثل صبغة الهيموتوكسلين - ايبوسين أو صبغة كمزا اذ يمكن مشاهدة مراحل تطور الطفيلي على الزغابات الدقيقة للأمعاء بأستعمال المجهر لضوئي تحت القوة  $\times 40$  و  $\times 100$  ويمكن أيضاً أستعمال المجهر الألكتروني الماسح (SEM) Scanning Electron Microscop أو المجهر النفاذ Electron Microscope (TEM) اذ تلاحظ الأطوار التطورية للطفيلي بشكل أجسام دائرية زرقاء بحجم يتراوح بين 2-5 مايكرومتر (Anderson & Bulgin , 1981) .

### 3.11.2: الأختبارات المناعية والمصلية Immunological and serological test

تعد هذه الطرائق أكثر حساسية من طرائق التلوين التقليدية وان تقنيات التلوين المناعي باستخدام الأجسام المضادة التي تتعارض مع مستضد جدار كيس البيض هي طرائق أخرى مفيدة وتعتمد على الأجسام المضادة المناعية التي لها حساسية كبيرة (Widmer *et al.*, 2015). وتتضمن الأختبارات المناعية والمصلية عدة اختبارات منها:

أ. اختبار اللاتكس (Latex test) يعتمد مبدأ عمل هذا الاختبار على الكشف عن وجود الأجسام المضادة IgM, IgG, IgA ويظهر التلازن الدموي نتيجة لحصول تفاعل الأجسام المضادة والمستضدات (Casemore, 1999).

ب. اختبار التآلق المناعي المباشر وغير المباشر

#### Direct and indirect immuno fluorescenc assay ( IFA)

يكشف هذا الاختبار بصورة رئيسة عن مستضدات أكياس بيض الطفيلي وذلك بأستعمال اجسام مضادة معلمة بالفلورسين (Fluorescein isothiocyanate (FITC) أذ يتم التشخيص بشكل مباشر لداء الابواغ الخبيثة بسبب قابلية هذا الاختبار على تمييز السلاسل المتعددة البيبتيدات للبيوغات ويستعمل في حالة قلة عدد أكياس البيض المفحوصة بالعينة (Bull *et al.*, 1998).

#### ج. اختبار الاليزا (Enzyme linked immuno sorbent Assay, ELISA)

يعد هذا الاختبار الأكثر حساسية والأكثر خصوصية من بقية الأختبارات المصلية الأخرى ويتميز بكفاءته العالية وسرعة الفحص ولا يتطلب الا جزءاً قليلاً من العينة للكشف عن الإصابة ويستخدم للكشف عن الكلوبولينات المناعية (الأجسام المضادة) من نوع IgG ، IgM المتخصصة ضد الطفيلي (Mc Cluskey *et al.* , 1995 ; Current & Synder, 1988).

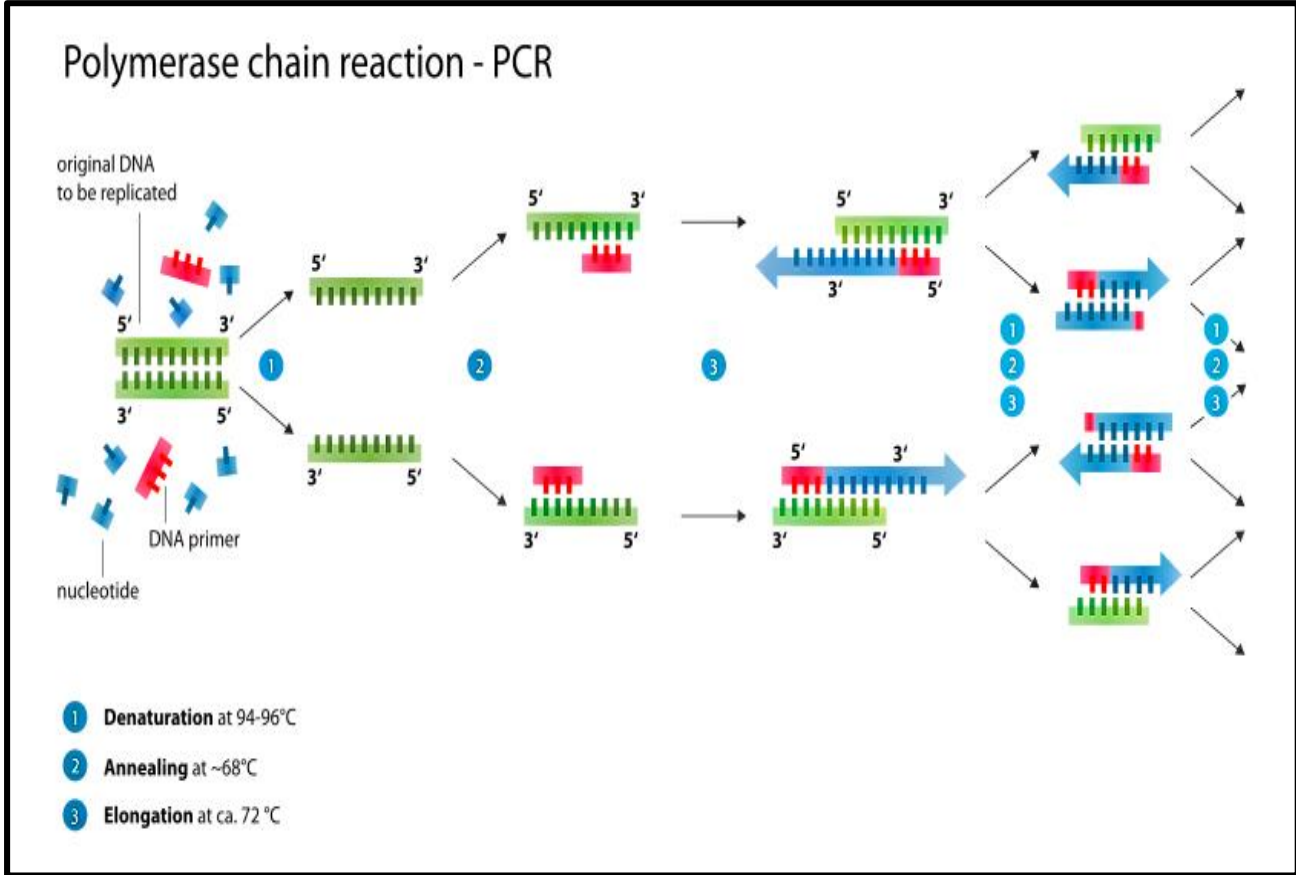
## 4.11.2: التشخيص الجزيئي: Molecular diagnosis

تم تطوير فحوصات جزيئية مختلفة للكشف عن الطفيليات في العقدين الماضيين بسبب خصوصية وحساسية هذه الفحوصات ، بدأ تشخيص الطفيليات باستخدام التقنيات الجزيئية حالياً التي كان من الصعب التعرف عليها باستخدام التقنيات التقليدية إذ يمكن معالجة هذه الطفيليات بسهولة (Tavares *et al.*, 2011;Xiao, 2010) ، يعد تطبيق الأساليب الجزيئية على الدراسات الوبائية جانباً مهماً أيضاً لأن تلك الأساليب تشمل التباين الجيني للسكان والتوزيع الجغرافي للأمراض الطفيلية والتحكم في العلاج والحساسية للإصابة والطفورات المحتملة فضلاً عن الارتباط بين المضائف والجوانب السريرية ومن ثم التمكين من فهم أفضل لسلوك المرض بين مجموعة سكانية معينة (Tavares *et al.*, 2011). سيتم وصف العديد من التقنيات المستخدمة في الكشف الجزيئي عن طفيلي الأبواغ الخبيثة.

### أ. تفاعل البلمرة المتسلسل ( PCR ) Polymerase chain reaction

تم اختراع تفاعل البلمرة المتسلسل ( PCR ) في عام 1983 من قبل Kary Mullis الذي حصل على جائزة نوبل في الكيمياء في عام 1993 (Aryal , 2015). يسمح هذا التفاعل بالتضخيم السريع لقطع الحمض النووي في المختبر وأصبح أداة أساسية في الدراسات الجينية والجزيئية (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). تتضمن هذه الدراسات العديد من التطبيقات التي تعتمد على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل أي تسلسل الحمض النووي وبصمات الحمض النووي والطب الشرعي والكشف عن البكتيريا أو الفيروسات وتشخيص الأمراض الوراثية (Valones *et al.*, 2009) . تتميز هذه التقنية بالحساسية وسهولة الاستخدام والقدرة على تحليل أعداد كبيرة من العينات في وقت واحد ( Morgan *et al.*, 1998 ) إذ تبين من خلال الدراسات أن تفاعل البلمرة المتسلسل أكثر حساسية ودقة من الفحوصات المناعية للكشف عن الطفيلي في عينات مختلفة (OIE, 2008). وأن الجينات الأكثر أستهدافاً هي جين 18S (SSU rRNA) وبروتين الصدمة الحرارية (HSP70) وبروتين جدار كيس البيض (CWOP) وجين glycoprotein GP60 (Jex & Gasser, 2010). نظراً لارتفاع حساسية هذه التقنية مقارنةً بالفحص المجهرى فإنها تعد تقنية مفيدة للكشف عن عدد كبير من الطفيليات في عينات البراز (Guy *et al.*, 2004). إلا ان الدراسات أوضحت عيباً رئيساً لهذه التقنية هو أنها تستغرق وقتاً طويلاً للغاية ولا توفر بيانات كمية ( Valones *et al.*, 2009). تبدأ عملية تفاعل البلمرة المتسلسل بأستخلاص الحامض النووي الـ DNA من البراز بأستعمال العدد الـ Kits الخاصة للأستخلاص وحسب الطريقة المعتمدة في الدراسات الأكاديمية (Goncalves *et al.*,2008)، ثم تضخيم جين بروتين جدار كيس البيض (CWOP) بأستعمال جهاز المدور الحراري Thermocycler إذ ينفصل الشريط الحامض النووي المزدوج الى شريطين بعملية تدعى فك الارتباط Denaturation وبعدها يرتبط الشريط عند أنخفاض درجة الحرارة

بالأجزاء المتممة له من القواعد النيروجينية لعينة الـ DNA بعملية تدعى الالتحام Annealing ، وبعدها يقوم أنزيم Taq DNA Polymerase بأضافة قواعد نيروجينية للجين المستهدف بعملية تسمى التمديد Extention ، بعدها يتم تكرار عمليتي التسخين والتبريد منتجة بذلك تضاعف كبير في عدد النسخ وبعد مرور 60 دورة فإن القطعة المفردة تتضخم الى مئات النسخ (White,1996) وأن خطوات هذه التقانة مبينه في الشكل (5-2).



شكل 5-2 : خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR (Aryal, 2015)

### ب. تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل Nested PCR

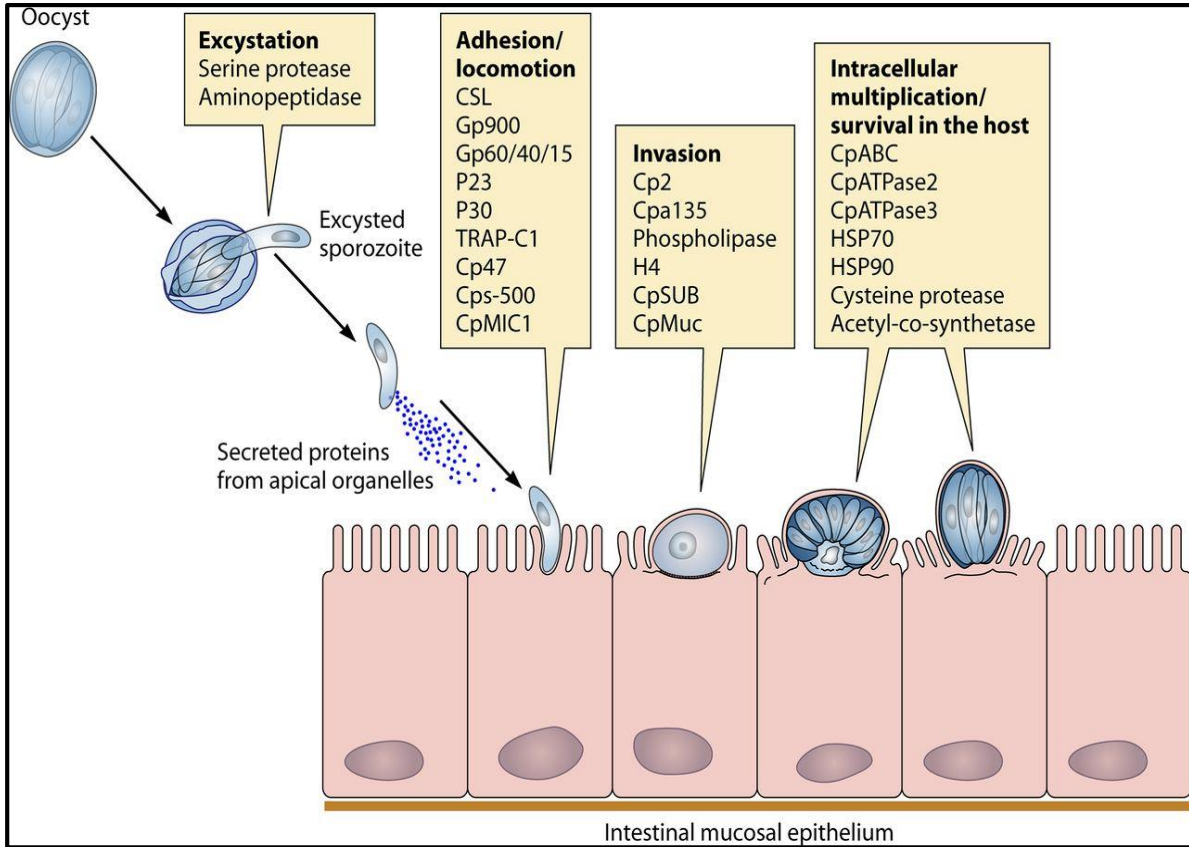
تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل Nested PCR هو تعديل لتفاعل البلمرة المتسلسل PCR الذي يهدف تضخيم مواقع الارتباط بين شريطي الحامض النووي الـ DNA مما يؤدي لتقليل الارتباط بينهما (Van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). يتضمن هذا التفاعل استخدام مجموعتين من البادئات المتخصصة لكل جين ، تستخدم في مرحلتين متتاليتين من تفاعل البلمرة المتسلسل بأستعمال جهاز الدور الحراري وبدرجات حرارة متخصصة لكل مجموعة من البادئات يتم في المرحلة الأولى من تفاعل البلمرة المتسلسل تضخيم هدف محدد من قطع الحامض النووي ، أما في المرحلة الثانية من تفاعل البلمرة المتسلسل يتم فيها تضخيم هدف ثانوي حدد في المرحلة الأولى مما يحد من تضخيم الأهداف غير المحددة ، أذ يجب أن تقوم مجموعة التمهيدي المتداخلة الثانية فقط بتضخيم الهدف

المقصود الذي ضخم في المرحلة الأولى من التضخيم من خلال تشغيل المزيد من الدورات الإجمالية في جهاز الدور الحراري وبدرجات حرارة معينة (Pedraza-Díaz *et al.* 2001).

## 12.2: آلية اختراق خلية المضيف Mechanism of Host Cell Invasion

يستطيع طفيلي الأبواغ الخبيثة غزو خلايا المضيف بعملية البلعمة (Phagocytosis) أو الاختراق النشط (Active Penetration) ويحتوي الطفيلي على المقعد القمي (Apical Complex) في مرحلة البويغات الذي يساعد على اختراق الحافة الفرشائية (Brush border) المعوية للمضائف المختلفة ومنها الانسان (Botero- Kleiven , 2006) ، ويؤدي ذلك الى حدوث انبعاث في غشاء الخلية ويكون موقع البويغ خارج الخلية كما تساعد مادة اللاكتين (Lactin) في عملية التصاق الطفيلي بالخلايا الطلائية وكذلك تستطيع البويغات ان تنتج بروتينا سكريا (CSL) وهي مادة رابطة تساعد على التصاق الطفيلي بالخلية الظهارية المعوية للمضيف وتكوين الفجوة الحاملة للطفيلي (Cerallos *et al.*, 2000).

بينت الدراسات أنه يتم تغليف الطفيلي والفجوة بغلاف مكون من امتدادات سايتو بلازمية توجد في غشاء الخلية المضيفة تعرف بالغلاف السكري المركب (Glycocalyx) الذي يتكون من مادة كاربوهيدراتية (Umemiya *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2004) ، يكون الطفيلي وفجوته في خلية المضيف خارج السيتوبلازم وتعمل منطقة الاتصال (Attachment zone) على تكوين حاجز فيزيائي في منطقة اتصال بروتوبلازم الخلية بالطفيلي وتؤدي هذه التغييرات الى تكوين عضية التغذية (Tzipori, 1988). يتميز اختراق طفيلي الأبواغ الخبيثة للخلايا الظهارية بأنه يقوم بتعطيل وتحطيم غشاء الخلية إذ تم توثيق تلف الخلايا وزيادة في معدلات موت الخلية المضيفة بسبب إفراز عدة جزيئات منها Hemolysins, phospholipase وكذلك أيونات Ca<sup>+</sup> وأنزيم Proteases الذي له دوراً كبيراً في التوسط في تحلل البروتين وغزو الخلية المضيفة والتهرب من مناعة المضيف ومن ثم موت الخلية المضيفة (Bouزيد *et al.*, 2013) وكما موضح بالشكل (2-6).



شكل 2- 6 : الية اختراق طفيلي الابواغ الخبيثة لخلية المضيف (Bouzid *et al.*, 2013)

## 13.2: الاستجابة المناعية Immune Response

تتضمن الدراسات المكثفة التي اجريت على نماذج حيوانية فكرة مهمة هي وجود الاستجابة المناعية للمضيف اتجاه طفيلي الأبوغ الخبيثة وأن قدرة هذه النماذج على تفسير الاستجابة المناعية البشرية محددة وتختلف الصورة السريرية في القوارض عن تلك الموجودة في الإنسان إذ لا تصاب الفئران بالإسهال بعد الإصابة وكذلك بينت الدراسات ان الاستجابة المناعية اتجاه الطفيلي تختلف اختلافاً كبيراً في البشر عن تلك الموجودة في الحيوانات ( Acroix *et al.*, 2001 ) تشمل الاستجابة المناعية للمضيف مكونات لكل من الجهاز المناعي الفطري والتكيفي ( المكتسب ) اذ تشترك كل من الاستجابة المناعية الفطرية (Innate immunity response) والاستجابة المناعية المكتسبة ( Adaptive immunity response ) في الدفاع عن الجسم والسيطرة على الطفيلي (Mead , 2014). و تلعب المناعة الفطرية بجميع مكوناتها دوراً مهماً في مقاومة الطفيلي ومن هذه المكونات خلايا البلعم الكبير (Macrophages) والخلايا العدلة (Neutrophils) والخلايا القاتلة الطبيعية ( Natural Killer cells ) وخلايا أخرى مثل الخلايا الطلائية (Epithelial cells) والأرومات الليفية (Fibroblast) التي تعمل على الحد من تكاثر الطفيلي وتحجيمه وتنشيط الاستجابة المناعية المتخصصة (Specific immune respons) (Pifer & Yarovsky, 2011). وتؤدي



الحالة المناعية للمضيف دوراً حيوياً في حصول المرض لاسيما في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة وقد بينت الدراسات ان الاجسام المضادة في تجويف الامعاء تمارس تأثيراً وقائياً ضد الإصابة (Ryan & Ray, 2004) أذ وجد عند الابتلاع تواجه أكياس البيض والبويضات المفترزة أولاً مكونات مناعية فطرية على طول الجهاز الهضمي في الإنسان والتي تشمل الحماية المناعية الفطرية للطبقة المخاطية السميكة للخلايا الظهارية المعوية ومنها الحركيات الكيميائية (Chemokines) والحركيات الخلوية (Cytokines) والبيبتيدات المضادة للمكروبات (antimicrobial peptides) والجراثيم والفايروسات التي تفرز في تجويف الامعاء او في الطبقة تحت المخاطية و مجرى الدم ( pantenburg et al.,2008). وكذلك تبرز اهمية الاستجابة المناعية التكيفية اثناء الإصابة بالطفيلي من خلال تكوين الخلايا المناعية CD4T و CD8T في المرضى المصابين بالطفيلي (Borad word , 2010). غالباً ما ينظر الى شدة المرض لدى البشر على انها تتناسب كلياً مع ارقام خلايا CD4T و CD8T وقد اكتشف مؤخراً ان داء الأبواغ الخبيثة المستمر في قرود المكاك كان اكثر وجوداً في القرود المصابة بفيروس نقص المناعة والتلف الفيروسي للأنسجة للمفاوية في الامعاء (Singh et al., 2011) كما أن للمناعة الخلوية دوراً كبيراً أثناء الإصابة بالطفيلي اذ تم الكشف عن ارتفاع مستويات لـ IgG و IgM و IgA أثناء الإصابة ( Ryan et ؛ Calderwood et al. 2011) (Wamae et al.2014؛ Wanyiri et al., 2014؛ al.,2012).

## 14.2: العلاج Treatment

أوضحت بعض الدراسات والأبحاث ان علاج الإصابة بالطفيلي يعتمد كلياً على حالة العلاج المناعي للمضيف (Rossignol et al., 2001). ونظراً لأن المرض يحد من نفسه في الإنسان ذي الكفاءة المناعية (البالغين والأطفال) فلا حاجة إلى علاج معين كما هو الحال في أي مرض من أمراض الإسهال التي يصاب بها الإنسان (Clark,1999) وإنما يعالج المصاب بأعطاءه السوائل ومحاليل الأرواء التي تحتوي على كلوريد البوتاسيوم والصوديوم وفيتامين B,A لتلافي حدوث الجفاف لاسيما عند الأطفال الرضع (Rossignol ,2010). ولم يكن علاج داء خفيات الأبواغ مرضياً حتى عام 2002 حيث تم فحص أكثر من 100 عاملاً مضاداً للمسببات المرضية بحثاً عن نشاط ضد طفيلي الأبواغ الخبيثة ومعظمها كان بدون تأثير تماماً (Farthing ,2006).

أستطاع الباحث ( 2004 ) Megremis et al. أن يؤكد أنه لم تتم الموافقة على أي دواء لعلاج داء خفيات الأبواغ مثل Nitazoxanide (NTZ) في 2002 وهو أحد مشتقات Nitrothiazolyl-Salicylamide الذي تمت الموافقة عليه مؤخراً من قبل إدارة الغذاء والدواء (FDA) لعلاج الطفيلي في المرضى ذوي الكفاءة المناعية وقد أثبتت فعاليتها ضد المرضى المصابين بالطفيليات الأبتدائية المعوية ومنها طفيلي الابواغ الخبيثة ويكون العلاج بدورة مدتها ثلاثة أيام من

Nitazoxanide أذ يقلل من مدة الإسهال في كل من المرضى ذوي الكفاءة المناعية والذين يعانون من نقص المناعة (Rossignol *et al.* 2001). كما يجب الانتباه إلى السوائل والإلكتروليتات والأدوية المضادة للطفيليات وكذلك الدعم الغذائي الذي يضمن أفضل علاج للطفيلي (Checkley *et al.*, 2015). وقد أكد (Sparks *et al.* 2015) أن Nitazoxanide يكون غير فعال في المرضى الذين يعانون من ضعف المناعة الشديدة يفضل تناول العلاج المضاد للفيروسات لاسيما الأشخاص منقوصي المناعة مما يقلل بشكل كبير من انتشار الطفيلي وطول مدة اصابته وشدها وكذلك يقلل من مساره السريري ويُعزى هذا التأثير إلى استعادة مناعة المضيف (Alyousefi, 2012). أما علاج Promomycin فقد أستعمل لعلاج الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة عند مرضى الأيدز أن أعطائه يؤدي الى تقليل الإصابة بالطفيلي وتصحيح شكل الأمعاء ووظيفتها (White *et al.*, 1994).

## 15.2: السيطرة والوقاية Prevention and Control

يمكن لأكياس بيض الطفيلي أن تبقى قابلة للإصابة في الماء لمدة 140 يومًا تقريبًا (Hooda *et al.*, 2000). وبسبب صغر حجم هذه الأكياس ومقاومتها للكلور والمطهرات الأخرى التي تعتمد على الأدهايد أو الأمونيا أو الكحول أو المركبات القلوية في محطات معالجة المياه فلا يمكن عادة ضمان الإزالة الكاملة لها (Sunnotel *et al.*, 2010). وللسيطرة على انتشار الطفيلي يوصي مركز السيطرة على الأمراض بغسل اليدين لمدة 20 ثانية على الأقل قبل التعامل مع الطعام أو تناوله وبعد التعامل مع أي براز سواء كان إنساناً أو حيواناً ولا ينبغي استخدام معقمات الأيدي التي تحتوي على الكحول لأنها لا تقتل الطفيلي بشكل فعال ويجب التخلص من الطفيلي بعد التعقيم بتراكيز عالية من بيروكسيد الهيدروجين (62%) والأشعة فوق البنفسجية (Ultraviolet light (Public Health Agency of Canada, 2011) كذلك يجب تجنب ابتلاع الماء عند السباحة في المسابح وتعقيم دورات المياه المستخدمة للأطفال في كثير من الأحيان وفحص الحفاضات في كل ساعة تقريباً وكما يجب على الشخص المصاب بالطفيلي عدم السباحة لمدة أسبوعين على الأقل (Mayo, 2014). فضلاً عن الاحتياطات الأخرى التي لها دوراً كبيراً في السيطرة على هذا الطفيلي (غسل أيدي العاملين بالمستشفى واستخدام القفازات والأقنعة المستخدمة عند توقع ملامسة سوائل الجسم للمرضى المصابين بخفيات الأبواغ (Bruce *et al.* 2000). يتعافى الأشخاص ذوي المناعة الصحية الجيدة من الطفيلي دون أي تدخل طبي وللمساعدة في عملية الشفاء يجب شرب الكثير من السوائل واتباع نظام غذائي مناسب وتجنب الكافيين والمشروبات الكحولية اما الاشخاص الذين يعانون من ضعف و نقص المناعة والاطفال الرضع والنساء الحوامل يجب عليهم الاستشارة الطبية.

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

**Materials & Methods**

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل **Materials & Methods**

**1.3: مواد العمل Materials**

**1.1.3: الأجهزة والمستلزمات المختبرية العامة**

جدول 1-3 : الأجهزة والمستلزمات المختبرية المستعملة في هذه الدراسة والشركات المصنعة لها وبلد المنشأ .

البلد	الشركة	أسم الجهاز
Japan	Haramaya	Autoclave
England	GallenKamp	Burner
Germany	Hettich	Cooling centrifuge
Japan	Sony	Digital Gamara
Germany	Mammert-	Electric Oven
sweedden	Pharmacia	Electrophoresis power Supply
Korea	Bioneer	Eppendorf tubes
Canada	Bio Basic	Gel electrophoresis
Germany	Heidolph	Hot plate with magnetic stirrer
Germany	Mammert	Incubator
Japan	Olympus	Light microscope
England	Sigma	Milipores Filters
Germany	Huawei	Multi-channel pipette (20-200)
Germany	Huawei	Micropipette in different sizes (µl) (0.5-10), (5-50), (10-100) & (100-1000)

Korea	Optizen Pop	Nano drop Spectrophotometer
Canada	Bio Basic	Nitrile powder free gloves
Korea	Bioneer	PCR thin wall tubes 0.2 m
India	Superestar	Plastic test tube
China	Sterile Eo.	Plastic Containers
Japan	Concord	Refrigerator
England	GallenKamp	Sensitive balance
India	Superestar	Slides and cover slides
Germany	Biometra	Thermocycler apparatus
Europen	ECX-15.m	Ultraviolet translluminato
Belgium	Cyan	Vortex Mixer
Germany	Mammert-	Water Bath
Japan	OgawaSeiki	Water distillator

### 2.1.3: المواد البايولوجية و الكيمائية

جدول 2-3: المواد البايولوجية والكيمائية المستعملة في الدراسة الحالية.

البلد	الشركة	أسم المادة
Canada	Biobasic	Agarose
England	BDH	Carbolfuchsin
South Africa	KAPA	DNA Ladder (100)bp
England	BDH	Ethanol Alcohol % 95
Canada	Biobasic	Ethidium Bromide

England	BDH	Iodine stain
England	BDH	Malachite green
England	BDH	MethanolAlcohol 100%
Egypt	Haidylena	Normal Saline
England	BDH	Oil immersion
Korea	Bioneer	Nuclease free water
England	BDH	Phenol
England	BDH	Potasum Dicromate

### 3.1.3: العدد المختبرية Laboratory kits

#### 1.3.1.3: العدد التشخيصية Diagnostic Kits

أ. استعملت العدة Cer test crypto : شركة Biota الإسبانية في التشخيص المناعي لطيفلي الأبواغ الخبيثة .

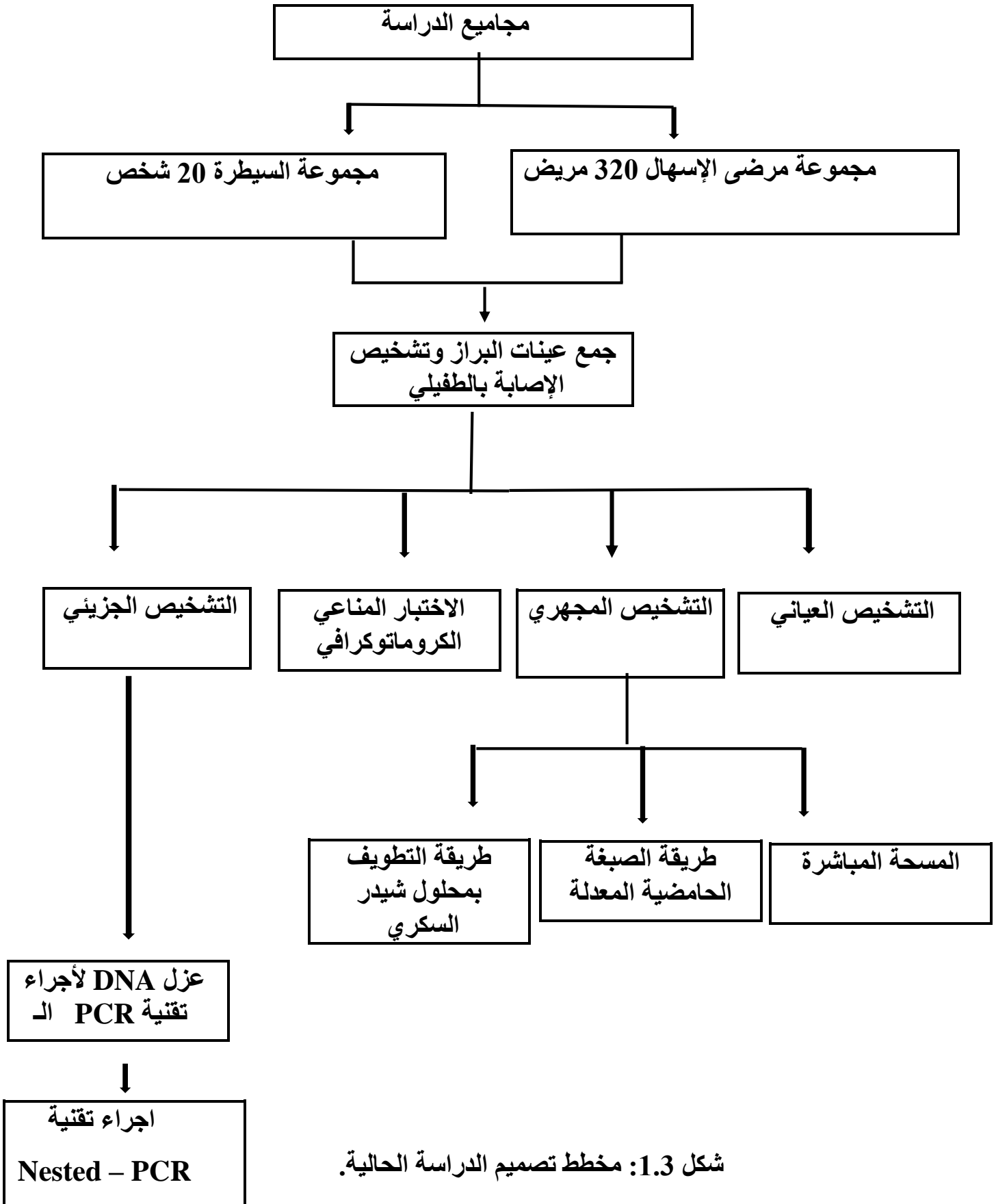
ب. عدة فحص الـ PCR AccuPower PCR Pre-Mix Kit : شركة Bioneer الكورية . في التشخيص الجزيئي لطيفلي الأبواغ الخبيثة .

#### 2.3.1.3: عدد عزل المادة الوراثية DNA Isolation Kits

أستعملت العدة Stool DNA Extraction Kits : شركة Geneaid الكورية لعزل الحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNA) لطيفلي الابواغ الخبيثة من براز المرضى .

### 2.3: تصميم الدراسة Study design

صممت الدراسة الحالية وفق المخطط الاتي شكل 1.3 :



### 1.2.3: مرضى الإسهال Diarrheal Patients

شملت الدراسة 320 مريض بالأسهال ممن أدخلوا مستشفى الحسين العام ومستشفى كربلاء التعليمي للأطفال في محافظة كربلاء خلال المدة من بداية شهر أيلول (2020) – نهاية شهر شباط (2021) ، وأجراء الفحوصات التشخيصية والمختبرية للإصابة بداء الأبواغ الخبيثة والمبينة لاحقاً وزع المرضى على مجموعتين وكالاتي  
أ - مجموعة مرضى الأسهال المصابين بداء الأبواغ الخبيثة.  
ب - مجموعة السيطرة (Control group).

### 2.2.3 : جمع عينات البراز Collection of Stool Samples

تم جمع عينات البراز من المرضى والسيطرة (أطفال وبالغين ، ذكورا وإناثا) والمراجعين الى مدينة الأمام الحسين (ع) الطبية ومستشفى كربلاء التعليمي للأطفال في محافظة كربلاء بعد أخذ موافقة المريض والسيطرة لإجراء الفحوصات المختبرية الخاصة للكشف عن الطفيلي والتي تعد جزء من أخلاقيات عمل الباحث لإنجاز بحثه ، اذ تم جمع 340 من عينات البراز بحجم حوالي 20 غراماً ووضعها في عبوات بلاستيكية معقمة ذات غطاء محكم للحفاظ على رطوبة العينات ومنع جفافها ودون عليها اسم المريض والعمر والجنس ونقلها إلى مختبر الطفيليات في كلية الطب البيطري جامعة كربلاء. فضلاً عن ذلك ، تم أعتمدت استمارة استبيان تحتوي على بعض المعلومات من المرضى من حيث منطقة الإقامة والجنس والفئات العمرية والأشهر (الملحق 1). تم بعد ذلك فحصت العينة عيانياً من حيث ملاحظة اللون والقوام ورائحة الغائط ووجود أو عدم وجود الدم والمخاط خلال فترة لا تزيد عن نصف ساعة من الوقت تمهيداً لأجراء الفحوصات المجهرية والمناعية أما ما تبقى من الغائط فقد وضع في أنابيب معقمة ومحكمة وحفظت بدرجة حرارة - 20 م لحين عزل الحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNA) للطفيلي واجراء فحص تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR.

### 3.3: تحضير المحاليل والصبغات

#### Preparation of Stains and Solutions

#### 1.3.3: محلول شيندر السكري Sheather's Solution

حضر محلول شيندر السكري بإذابة 500 غراماً من السكر في 320 مليلتر من الماء المقطر مع 6.5 غرام من الفينول كمادة حافظة وحسب الطريقة المتبعة من قبل الباحثان (Chermette & Boufassa, 1998).



### 2.3.3: محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم 2 % Potassium dichromate

حُضِر بإذابة 25 غرام من ثنائي كرومات البوتاسيوم ثم يكمل الحجم الى 1000 مل من الماء المقطر وحسب الطريقة المتبعة من قبل (Ma & Soave, 1983).

### 3.3.3: المحلول الملحي الطبيعي Normal Saline

حُضِر بإذابة 0.9 غرام من كلوريد الصوديوم NaCl في لتر من الماء المقطر Distilled water وثبت الأس الهيدروجيني pH عند 7.2 (Cruickshank *et al.*, 1975).

### 4.3.3: محلول صبغة بروميد الاثيديوم (0.5%) Ethidium bromide

حُضِر هذا المحلول بإذابة 0.25 غم من صبغة بروميد الاثيديوم في 50 مل من الماء المقطر المعقم في قنينة معقمة للحصول على التركيز النهائي 5 مليغرام/ملي.

### 5.3.3: صبغة كاربول فيوشين Carbol Fuchsin stain

- 1- تم إذابة 4 غم من بلورات الفوشسين في 20 مل من الكحول الإيثيلي (95%).
- 2- تمت إضافة 8 غم من بلورات الفينول في 100 مل من ماء الإساله في حمام مائي عند درجة 56م وخلطها جيداً بواسطة قضيب زجاجي.
- 3- يتم استخدام الصبغة مباشرة أو تخزينها في زجاجة داكنة في درجة حرارة الغرفة لاستخدامها لاحقاً (Beaver & Jung, 1985).

### 6.3.3: صبغة الملكيت الخضراء 5% Malachite Green Stain

أذيب 5 غم من صبغة الملكيت الخضراء في 100 مل من الماء المقطر.

### 7.3.3: الكحول المحمض Acidic Alcohol

حضر بإضافة 3 مل من حامض الهيدروكلوريك المذاب في 97 مل من الكحول الإيثيلي 95%. (Cole *et al.*, 1999).

## 4.3: طرائق العمل المختبرية Laboratory Methods

### 1.4.3: فحص العينات Sample examination

فُحصت العينات مباشرة في وحدة الطفيليات العائدة إلى مستشفى الحسين (ع) التعليمي للأطفال بأسرع وقت بعد جمع العينة لأن تأخير فحص العينة يؤدي الى صعوبة ظهور بعض الأطوار وبالتالي صعوبة تمييز الإصابة بالطفيلي، وتم فحص العينة على مرحلتين:

### 1.1.4.3: الفحص العياني Macroscopic examination

يقصد بالفحص العياني وصف المظهر العام لعينة البراز من حيث الشكل Form والقوام Consistency لمعرفة قوام نموذج البراز من حيث كونه طرياً Soft أو مائياً Watery أو صلباً قوياً Well – formed أو يظهر بشكل أسطواني وكذلك تمت ملاحظة نموذج البراز من حيث كونه دمويًا Bloody أو مخاطياً Mucous أذ أن وجود الدم دلالة على حدوث الإصابة بالطفيليات فضلاً عن ملاحظة لون ورائحة الغائط التي تكون متعفنة أو فاسدة أو حامضة كرائحة الزرنيخ في الحالات غير الاعتيادية ( Ichpujani & Bhatia , 1994 ).

### 2.1.4.3: الفحص المجهرى Microscopic examination

شمل الفحص المجهرى للعينة استخدام طريقتين هما طريقة التطويف بأستعمال محلول شيدر السكري وطريقة الصبغة الحامضية المعدلة

أ . عزل أكياس البيض من البراز بأستعمال محلول شيدر السكري بطريقة التطويف

#### مبدأ الاختبار Principle of test

يعتمد مبدأ الاختبار بطريقة التطويف بأستعمال محلول شيدر السكري إلى تحويل كثافة المحلول إلى كثافة أعلى من كثافة الطفيليات مما يؤدي إلى زيادة تركيز أكياس البيض وتعتمد هذه الطريقة أيضاً على التدرج في الجاذبية النوعية (Specific gravity) لكل من المحلول الكيميائي من جهة وأكياس البيض وبقية مواد الغائط من جهة أخرى (Faust et al., 1970).

#### طريقة العمل Assay Procedure

تمت هذه الطريقة بعد أخذ العينات المحفوظة في مادة ثنائي كرومات البوتاسيوم ثم وضعت العينات في أنابيب إختبار سعة 15 مليلتر ثم غسلت العينة بالماء المقطر (Distilled water) عدة مرات للتخلص من مادة ثنائي كرومات البوتاسيوم وبعدها يتم التخلص من اللون الأصفر للبراز عن طريق وضع الراشح في جهاز الطرد المركزي بسرعة 1000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق حتى يصبح اللون رائق وبعدها يضاف الى الراشح 10 مليلتر من محلول شيدر السكري مع المزج جيداً لمدة 20 دقيقة بجهاز الطرد المركزي بسرعة 700 دورة / دقيقة حتى يتم الحصول على تركيز عالي من أكياس البيض تطفو في الطبقة العليا ولهذا تعرف هذه الطريقة بطريقة التطويف وتكرر هذه العملية عدة مرات على البراز المتبقي لكي يتم الحصول على كمية أكبر من أكياس البيض وبعدها تركت الأنابيب لفترة من 10 - 15 دقيقة حتى يستقر الراشح وبعدها سحبت قطرة من سطح الراشح بواسطة ماصة ووضعت على شريحة زجاجية وغطيت

بغطاء الشريحة وبعدها فحصت تحت المجهر الضوئي بقوة 40 × ثم بقوة 100 ×  
(Anderson, 1981).



شكل 2.3: يوضح عملية التطوير لعينات البراز باستخدام محلول شيدر السكري  
ب. استعمال طريقة الصبغة الحامضية المعدلة

### Modified Acid Stain method

#### . مبدأ الاختبار Principle of test

يعد التشخيص المجهرى باستعمال الصبغة الحامضية المعدلة (الزيل - نيلسون) Modified Ziehl-Neelsen Stain Method أكثر استخداماً للكشف عن أكياس بيض طفيلي الأبواغ الخبيثة بسبب بساطتها وقلة تكلفتها وتوفر الصبغة لذلك فإن التشخيص المجهرى يعتمد على تصبغ المسحة المأخوذة من براز الشخص المصاب بالصبغة الحامضية المعدلة (Adam et al., 2007). إذ تتلون أكياس البيض باللون الأرجواني الذي يميزها عن بقية البراز الذي يتلون باللون الأزرق (Sevinc et al., 2005).

#### . طريقة العمل Assay Procedure

يجب أن تكون المسحة المأخوذة من البراز مناسبة أي لا تكون سميكة أو رقيقة جداً بحيث لا يمكن مشاهدة محتويات البراز و فحصت العينات بطريقة الصبغة الحامضية المعدلة حسب الطريقة المعدة من قبل الباحثان (Beaver & Jung , 1985).

- 1- أخذت كمية صغيرة من البراز بواسطة عيدان خشبية معقمة برأس قطني وتوضع على شريحة زجاجية نظيفة تحت درجة حرارة الغرفة الجافة وتفرش العينة على طول مساحة الشريحة الزجاجية وتركت بدرجة حرارة الغرفة لتجف.
- 2- ثبتت المسحة بإضافة قطرات من الميثانول لمدة 5 دقائق.
- 3- غمرت المسحة بصبغة الكاربول فيوكسين (Carbol fuchsin) ثم مررت فوق لهب هادئ بواسطة Burner لمدة بين 10-15 دقيقة حتى تبدأ الصبغة بالتبخر.
- 4- غسلت المسحة بماء الحنفية لمدة 10 ثواني.
- 5- قصر اللون بواسطة الكحول الحامضي خلال 30 ثانية. ثم غسلت في ماء الحنفية.
- 6- أضيفت قطرتان من صبغة المثلين الزرقاء الى المسحة وتركت لمدة دقيقتين ثم شطفت في ماء الحنفية لمدة 10 ثوان.
- 7 - جففت المسحة لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة .
- 8- فحصت المسحة بواسطة المجهر الضوئي بعد إضافة قطرة زيت اليها تحت قوة تكبير X100.

### 2.4.3: الاختبار الكروماتوكرافي المناعي

#### Flow chromatographic immunoassay (Cer test crypto):

أجري الاختبار اعتماداً على العدة التجارية المجهزة من قبل شركة Biota الإسبانية للكشف عن الأضداد النوعية لطفيلي الأبوغ الخبيثة.

#### . مكونات العدة kit contents

أ. أشرطة بلاستيكية (Plastic cassettes) تحتوي على حفرة (Well) في إحدى الجهتين ، أما الجهة المقابلة تكون بشكل لوحة (Pad) مكونة من شريط غشائي Nitrocellulose ومطلي بمستضدات الطفيلي وتحتوي على خطوط .

ب. محلول دارئ مخفف للعينة .

ج. قطارات بلاستيكية نابذة (Disposable) .

#### . مبدأ الاختبار Principle of test

يعتمد الاختبار على التفاعل بين الأضداد الموجودة في البراز المطلوب فحصه والمستضدات المطلية بها لوحة الاختبار أذ تكون نتيجة التفاعل حدوث تلوين يمكن ملاحظته بالعين المجردة ، وهذا اللون يتكون نتيجة انتقال (هجرة) العينة بعد وضعها بالحفرة الخاصة بها ونتيجة للخاصية الشعرية عبر الغشاء فأذا كانت العينة المطلوب فحصها تحتوي على أضداد سوف ترتبط مع مستضدات الطفيلي الموجودة على الغشاء مكونة معقد مناعي أحمر اللون في منطقة الخط

مشيراً بذلك الى إيجابية الفحص (Positive) وفي حالة عدم تلوين الخط فهذا دليل على سلبية الفحص (Negative) .

### **طريقة العمل Assay Procedure**

قبل البدء بعملية الاختبار تركت عينات البراز وعدة الاختبار المبردة للوصول إلى درجة حرارة الغرفة 15-30 درجة مئوية ثم أستخرج شريط الفحص من عدة الاختبار ووضع 50 مايكرو ليتر من عينة البراز المطلوب فحصه في الحفرة المخصصة للعينة المراد فحصها بعد إزالة الجزيئات الصلبة من العينة وبعدها وضع 50 مايكرو ليتر من محلول تخفيف العينة بالحفرة نفسها . تقرأ النتائج في 10 دقائق إذ يلاحظ التغير اللوني للشريط بالعين المجردة للاستدلال على نتيجة الفحص إذا لم يتم إجراء الاختبار بسبب الجسيمات الصلبة نَقَلَب العينات المضافة في حفرة العينات وأزاله الأجسام الصلبة (Marshall *et al.*,1997).

### **قراءة النتائج Result Estimation**

**نتيجة إيجابية:** يظهر شريط ملون باللون الأحمر على مناطق خط الاختبار، بالإضافة إلى خط أخضر في منطقة خط التحكم.

**نتيجة سلبية:** لا يوجد خط يظهر في منطقة خط الاختبار. يظهر خط أخضر مميز على منطقة خط التحكم.

**غير صالح:** لا يصبح خط التحكم المجاور لخط الاختبار مرئياً في غضون 10 دقائق بعد إضافة العينة.

### **3.4.3: الفحص الجزيئي Molecular Examination**

يتم التحري عن دنا طفيلي الأبواغ الخبيثة باستعمال تقنية Nested PCR من عينات البراز لمجاميع الدراسة وذلك اعتماداً على تضخيم جين الطفيلي التشخيصي (COWP) وفقاً للطريقة التي وصفها (Wanget *et al.*, 2014).

### **أولاً : عزل الدنا من عينات البراز DNA isolation from stool sample**

يتم استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA لطفيلي الأبواغ الخبيثة من عينات البراز المأخوذة من الأشخاص المصابين بالإسهال باستخدام عدة الاستخلاص Stool DNA Extraction Kit المجهزة من شركة Geneaid الكورية وتبعاً لخطوات طرائق العمل الموضحة من قبل الشركة .

### **مكونات العدة kit contents**

يمكن معرفة مكونات عدة عزل الدنا من خلال الجدول رقم (3-3).

جدول 3-3: مكونات عدة استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين.

Amount	Contents
85 ml	ST1 Buffer
30 ml	ST2 Buffer
160 ml	ST3 Buffer
25 ml	Wash Buffer2
30 ml	Elution Buffer
100 pcs	Inhibitor Removal Column
100 pcs	GD Column
100 pcs	Beadbeating Tube (Type C )
100 pcs	2 ml Centrifuge Tube
100 pcs	2 ml Collection Tube

### طريقة العمل Assay Procedure .

وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة للعدة وبحسب ما مبين في الخطوات اللاحقة ، تم في البداية إضافة 80 مل من كحول الإيثانول المركز الى محلول الغسل (Wash Buffer) لحين استعماله في الخطوات الأخيرة من العمل .

### أ . تحلل العينة Sample Lysis

تم نقل 200 ملي غرام من عينة البراز المراد فحصها إلى أنبوب Bead beating الذي يحتوي على خرز خزفي ، ثم تمت إضافة 800 ميكرو لتر من ST1 Buffer وبعدها مزجت محتويات الأنبوبة بصورة جيدة بواسطة جهاز المازج الدوار (vortex)، ثم حضنت الأنبوبة في حمام مائي لفترة وجيزة عند 70 درجة مئوية لمدة 5 دقائق وبعدها نقلت محتويات الأنبوبة إلى جهاز المازج الدوار مرة أخرى بسرعة عالية لمدة 10 دقائق . تم توصيل أنابيب Bead beating أفقياً بدوامة قياسية بأقصى سرعة لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة. تم طرد أنابيب Bead beating في جهاز الطرد المركزي عند 8000 دورة / دقيقة لمدة دقيقتين في درجة حرارة الغرفة للتخلص من الرغوة التي تسببها المنظفات الموجودة في ST1 Buffer ونقل

بعدها 500 ميكرو لتر من السائل الطافي إلى أنبوبة أبندروف جديدة للطرد المركزي سعة 1.5 مل.

### ب . إزالة مثبط تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR inhibitor removal

تمت إضافة 150 مايكرو لتر من محلول ST2 buffer الى أنبوبة الابندروف الحاوية على السائل الطافي ثم نقلت الى جهاز المازج الدوار لمدة 5 ثواني . ثم حضنت أنبوبة الأبندروف عند درجة حرارة 4 لمدة 5 دقائق و نقلت أنبوبة الأبندروف الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 16000 دورة / دقيقة ولمدة 3 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لترسيب الجسيمات غير القابلة للتحلل ومثبطات تفاعل البلمرة المتسلسل. ثم وضعت أنبوبة الفلترة ذات اللون الأرجواني داخل انبوبة الطرد المركزي (Centrifuge tube) 2 مل ثم نقلت اليها 500 مايكرو لتر من سائل أنبوبة الابندروف ونقلت الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 16000 دورة /دقيقة لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة وبعدها تترك أنبوبة الفلترة ذات اللون الأرجواني ونأخذ أنبوبة الطرد المركزي .

### ج. ربط الدنا DNA Binding

أضيف 800 مايكرو لتر من محلول ST 3 buffer الى الخليط الموجود في انبوبة الطرد المركزي ويوضع بسرعة في جهاز المازج الدوار لمدة 5 ثواني . ثم وضعت أنبوب الفلترة ذات اللون الأخضر داخل أنبوب الجمع (Collection tube) 2 مل ونقلت اليه 700 من السائل الموجود في أنبوبة الطرد المركزي ونقل الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 16000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة ثم فرغ الراشح الموجود في أنبوبة الجمع وأعيدت انبوبة الفلترة اليه وبعدها أضيف المتبقي من انبوبة الطرد المركزي الى انبوبة الفلترة ذات اللون الأخضر ونقلت مرة أخرى الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 16000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة ثم فرغ الراشح المتجمع في انبوبة الجمع وأعيد انبوبة الفلترة إليه.

### د. الغسل Washing

أضيف 400 مايكرو لتر من محلول ST 3 buffer الى أنبوب الفلترة ذات اللون الأخضر الموضوع داخل انبوبة الجمع ونقل الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 16000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة ثم فرغ السائل المترشح في انبوبة الجمع وإعادة انبوبة الفلترة ذات اللون الأخضر اليها ، وبعدها أضيف 600 مايكرو لتر من محلول الغسل (Wash buffer) الى مركز انبوبة الفلترة ذات اللون الأخضر ونقلت الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 16000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة ثم قمنا بتفريغ

السائل المترشح في انبوبة الجمع وإعادة انبوبة الفلترة ذات اللون الأخضر اليها،أضيف 600 مايكروليتر مرة أخرى من محلول الغسل (Wash buffer) الى مركز انبوبة الفلترة الخضراء ونقلت الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 16000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة بعدها تم تفريغ بتفريغ السائل المترشح في انبوبة الجمع وإعادة انبوبة الفلترة ذات اللون الأخضر اليها .

### هـ. الأسترداد Elution

نقلت أنبوبة الفلترة ذات اللون الأخضر ومعها أنبوبة الجمع الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 16000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة لغرض التنشيف ثم فرغ السائل المترشح في انبوبة الجمع وإعادة انبوبة الفلترة ذات اللون الأخضر اليها . ونقل GD Column الى أنبوبة الأبندروف الجديدة وأضيف 70 مايكروليتر الى داخل مركز GD Column ونقل الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 16000 دورة / دقيقة لمدة دقيقتان بدرجة حرارة الغرفة ثم ترك GD Column وأخذ أنابيب الأبندروف المحتوية على ال DNA .

### ثانياً: تقدير الحمض النووي الجيني Genomic DNA estimation

فحص الحمض النووي الجيني المستخرج باستعمال جهاز Nano drop الذي يفحص ويقيس نقاوة الحمض النووي من خلال قراءة الامتصاصية عند 280/260 نانومتر ويتم في البداية تفسير الجهاز باستعمال الماء المقطر، ثم وضع 1 مايكرو ليتر من عينة الدنا في الجهاز وقرأت اذ يتراوح التركيز ما بين 10 -100 نانوغرام / مايكروليتر وتراوحت النقاوة بين 1.6-1.8 ، اذ يعد الحامض النووي نقياً عندما تكون نسبة شدة الامتصاصية بمعدل (1.8 +/- 0.2) (Melville,2004).

### ثالثاً: تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR

أ: تهيئة تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل Preparation of PCR reaction

أستعملت البادئات المتخصصة (Specific primers) لتضخيم جزء معين من جين COWP لطيفلي الأبواغ الخبيثة (Pedraza-Díaz et al., 2001) ؛ El-Missiry et al., (2019). والتي جهزت من شركة Bioneer الكورية والمبينة تفاصيلها بالجدول (3-4).



جدول 3-4: البادئات المستعملة لتضخيم جين الـ *COWP* لطفيلى الأبواغ الخبيثة .

Primer Primary		Sequence 5-----3	الحجم
Primer ( <i>COWP</i> )	F	5-ACCGCTTCTCAACAACCATCTTGTCCTC-3'	769
	R	5- CGCACCTGTTCCCACTCAATGTAAACCC-3'	قاعدة نيروجينية

Primer Secondary		Sequence 5-----3	الحجم
Primer ( <i>COWP</i> )	F(Cry- 15)	5'-GTAGATAATGGAAGAGATTGTG-3'	553
	R(Cry-9)	5'-GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG-3'	قاعدة نيروجينية

ب . تحضير المزيج الرئيسي لتفاعل البلمرة المتسلسل

### Primary PCR master mix preparation

حضر مزيج PCR الرئيس باستخدام Maxime PCR PreMix Kit وفقاً لتعليمات شركة Pioneer الكورية كما هو موضح في الجدول رقم (3-5).  
جدول 3-5: المزيج الرئيس لتفاعل البلمرة المتسلسل

PCR Master mix	Volume
DNA template 5-50ng	5µL
<i>COWP</i> Forward primer (10pmol)	1µL
<i>COWP</i> primer (10pmol)	1µL
Nuclease – free distilled water	13 µL
Total volume	20µL

بعد ذلك يتم وضع مكون مزيج PCR الرئيس المذكور في الجدول أعلاه في Maxime PCR PreMix القياسي الذي يحتوي على جميع المكونات الأخرى اللازمة لتفاعل PCR مثل (Taq) pH: 9.0, KCl, MgCl<sub>2</sub>, stabilizer, and DNA polymerase, dNTPs, Tris-HCl tracking dye والمثبت ، وتتبع الصبغة بعد ذلك ، يتم نقل جميع أنابيب PCR إلى أجهزة الطرد المركزي Exispin vortex بسرعة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق. ثم توضع في جهاز المدور الحراري Thermocycler .

### ج - ظروف تفاعل جهاز المدور الحراري

#### PCR thermocycler reaction conditions

ظروف جهاز المدور الحراري PCR باستخدام نظام التدوير الحراري PCR

( Gobet & Toze , 2001 ) ، كما موضح بالجدول التالي رقم ( 3-6 ).

جدول 3-6 : ظروف تفاعل جهاز المدور الحراري .

PCR step	Temp.	Time	Repeat
Initial Denaturation	95°C	5min.	1
Denaturation	95 °C	30sec.	30 cycle
Annealing	56 °C	30sec	
Extension	72 °C	1min.	
Final extension	72 °C	5min.	1
Hold	4 °C	Long time	-

تم إجراء التفاعل في مختبر الدراسات العليا / كلية الطب البيطري / جامعة كربلاء باستخدام جهاز المدور الحراري من إنتاج شركة Biometra الألمانية، اذ يعمل هذا الجهاز على تضخيم الجين المستهدف لطفيلي الأبواغ الخبيثة وان حجم القطعة المضخمة والناجمة من تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل (Amplicon PCR Produce) هو 769 زوج من القواعد النيروجينية (769bp). اذ تمت برمجة الجهاز للدورات الحرارية وفقاً لظروف التفاعل (Optimization) المبينة في الجدول (3-6).

#### د : تحليل المنتج لتقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

حلت منتجات تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل بطريقة الترحيل الكهربائي اذ أستعمل هلام الأكاروز (Agarose gel) في عملية الترحيل الكهربائي لمعرفة نواتج تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل . اذ أذيب واحد غرام من مسحوق هلام الأكاروز في 50 مل من الدارئ Tris-borate buffer على الهلام بتركيز 2 % وتمت الأذابة من خلال التسخين لمدة دقيقة واحدة في جهاز Microwave أو الى أن أصبح المحلول رائقاً . ثم برد عند درجة حرارة 50-60 درجة مئوية ومن ثم أضيف 3 مايكرو ليتر من محلول بروميد الأثيديوم (Ethidium Bromide) وبعدها صب هلام الاكاروز في قالب الترحيل (Tray) الذي يحتوي على مشط يحدد الحفرة الخاصة بوضع العينات . ترك الهلام لكي يتصلب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة وبعدها رفع المشط من الهلام بعناية ثم وضع قالب الترحيل في الحوض المستعمل للترحيل . بعدها حملت عينات نواتج تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل بواقع 5 مايكرو ليتر من كل عينة في حفر قالب هلام الأكاروز . وحمل أيضاً سلم الدنا (100 bp ladder) DNA بواقع 3 مايكرو ليتر المجهز من شركة Pioneer الكورية . ثم غمر هلام الأكاروز بالدارئ Tris-borate buffer وذلك بعد أكمل عملية التحميل ثم غلق جهاز الترحيل بعناية . وأوصلت الأقطاب الموجبة والسالبة لجهاز الترحيل في القالب وفي مواقعها المخصصة وبعدها مرر تيار كهربائي بفرق جهد 70 فولت ولمدة 1.5 ساعة . ثم رفع القالب بعد انتهاء مدة الترحيل وتم نقله الى جهاز Ultraviolet transilluminator ليتم فحصه باستعمال الأشعة فوق البنفسجية كمصدر ضوئي لتحديد الحزم المرحلة (Migrated bands) وقورنت مع سلم القياس ، وصورت الحزم باستعمال كاميرا رقمية ملحقة بالجهاز وتعد النتيجة موجبة بوجود دنا طفيلي الأبواغ الخبيثة اذا ظهرت حزمة ذات حجم 769 زوج من القواعد النيروجينية لجين COWP المستهدف (Fallah et al.,2008).

**رابعاً : تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل المتداخل Nested PCR**  
**أ . تحضير المزيج الرئيس المتداخل**

**Nested PCR master mix preparation**

حضر مزيج PCR الرئيس باستخدام ( Maxime PCR PreMix Kit ) وفقاً لتعليمات شركة Pioneer الكورية كما هو موضح في الجدول رقم (7-3).  
 جدول 7-3: تحضير المزيج الرئيس المتداخل.

Nested PCR Master mix	Volume
PCR product	2 $\mu$ L
<i>COWP</i> Forward primer (10pmol)	1 $\mu$ L
<i>COWP</i> Reverse primer (10pmol)	1 $\mu$ L
Nuclease – free distilled water	16 $\mu$ L
Total volume	20 $\mu$ L

بعد ذلك يتم وضع مكون مزيج PCR الرئيس المذكور في الجدول أعلاه في Maxime PCR PreMix القياسي الذي يحتوي على جميع المكونات الأخرى اللازمة لتفاعل PCR مثل ( Taq DNA polymerase و dNTPs و Tris-HCl pH: 9.0 و KCl و MgCl<sub>2</sub> والمثبت ، وتتبع الصبغة). بعد ذلك ، يتم نقل جميع أنابيب PCR إلى أجهزة الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق ثم وضع في المدور الحراري .

**ب. ظروف تفاعل جهاز المدور الحراري المتداخل**

**Nested PCR thermocycler reaction conditions**

تكون ظروف جهاز المدور الحراري PCR باستخدام نظام التدوير الحراري PCR (Gebot & Toze 2001) وكما موضح بالجدول التالي رقم ( 8-3 ).

جدول 3-8: ظروف تفاعل جهاز المدور الحراري المتداخل .

PCR step	Temp.	Time	Repeat
Initial Denaturation	95°C	5min.	1
Denaturation	95 °C	30sec.	30 cycle
Annealing	56 °C	30sec	
Extension	72 °C	1min.	
Final extension	72 °C	5min.	1
Hold	4 °C	Long time	-

ج . تحليل المنتج المتداخل لتقانة تفاعل البلمرة المتسلسل

### Nested PCR product analysis PCR

حللت منتجات تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل بطريقة الترحيل الكهربائي اذ أستعمل هلام الأكاروز (Agarose gel) في عملية الترحيل الكهربائي لمعرفة نتائج تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل المتداخل وبنفس طريقة الترحيل الكهربائي لتقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل اذ رفع القالب بعد انتهاء مدة الترحيل وتم نقله الى جهاز Ultraviolet transilluminator ليتم فحصه باستعمال الاشعة فوق البنفسجية كمصدر ضوئي لتحديد الحزم المرحلة (Migrated) bands وقورنت مع سلم القياس ، وصورت الحزم باستعمال كاميرا رقمية ملحقة بالجهاز وتعد النتيجة موجبة وبوجود دنا طفيلي الأبوغ الخبيثة اذا ظهرت حزمة ذات حجم 553 زوجاً من القواعد النيتروجينية لجين *COWP* المستهدف.

### 5.3: التحليل الإحصائي Statistical Analysis

تم تحليل البيانات التجريبية والأرقام والنسب المئوية بواسطة البرنامج الإحصائي SPSS إذ أستعمل التحليل الإحصائي ( $X^2$ ) Chi-Square ، وقيمة ( $P \leq 0.05$ ) ذات دلالة إحصائية لإيجاد الفروقات المعنوية بين المصابين ، بطفيلي الأبواغ الخبيثة من ناحية الجنس والعمر وأشهر الإصابة ومنطقة السكن ومياه الشرب (Hogg & Craig, 1995).

### 6.3: الحساسية والخصوصية Sensitivity & Specificity

أ . الحساسية Sensitivity

$$100 \times \frac{\text{عدد حالات الموجبة الحقيقية (TP)}}{\text{عدد حالات الموجبة الحقيقية (TP) + عدد حالات السالبة الكاذبة (FN)}} = \text{الحساسية}$$

ب . الخصوصية Specificity

$$100 \times \frac{\text{عدد حالات السالبة الحقيقية (TN)}}{\text{عدد حالات السالبة الحقيقية (TN) + عدد حالات الموجبة الكاذبة (FP)}} = \text{الخصوصية}$$

اذ أن

TP= True positive الموجب الحقيقي

TN= True negative السالب الحقيقي

FP= False positive الموجب الكاذب

FN= False negative السالب الكاذب

(Meredith *et al.*,1995)

الفصل الرابع

النتائج

**Results**

## الفصل الرابع

### Result النتائج

#### 1.4: تشخيص داء الأبواغ الخبيثة Diagnosis of Cryptosporidiosis

تم إجراء الدراسة الحالية على 320 مريضاً يعانون من الإسهال و20 عينة سيطرة ممن راجعو مدينة الأمام الحسين (ع) الطبية ومستشفى الحسين التعليمي للأطفال وكان الهدف من الدراسة هو تحديد نسبة الإصابة بداء الأبواغ الخبيثة لدى مرضى الإسهال في محافظة كربلاء. ولغرض الوصول للهدف فحصت عينات البراز بأستعمال ثلاث طرائق تشخيصية وهي المجهرية ، المناعية ، الجزيئية للكشف عن طفيلي الأبواغ الخبيثة في عينات البراز .

#### 2.4: نسبة الإصابة بطفيلي الابواغ الخبيثة حسب طريقة الفحص

أظهرت نتائج الفحوصات المجهرية والمناعية والجزيئية لـ 320 عينة اسهال و20 عينة سيطرة أن النسبة الكلية للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بلغت 8.1% بحسب نتائج الفحص المجهرية وذلك باستعمال الصبغة الحامضية المعدلة Modified Acid-Stain وبلغت 6.8% بحسب نتائج الفحص المناعي (Chromatographic immunoassay) كما بلغت 5.6% بحسب نتائج الفحص الجزيئي باستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وكما موضح بالجدول (1-4).

جدول 4- 1: النسبة المئوية للإصابة بحسب طرائق الفحص المجهرية والمناعية والجزيئية.

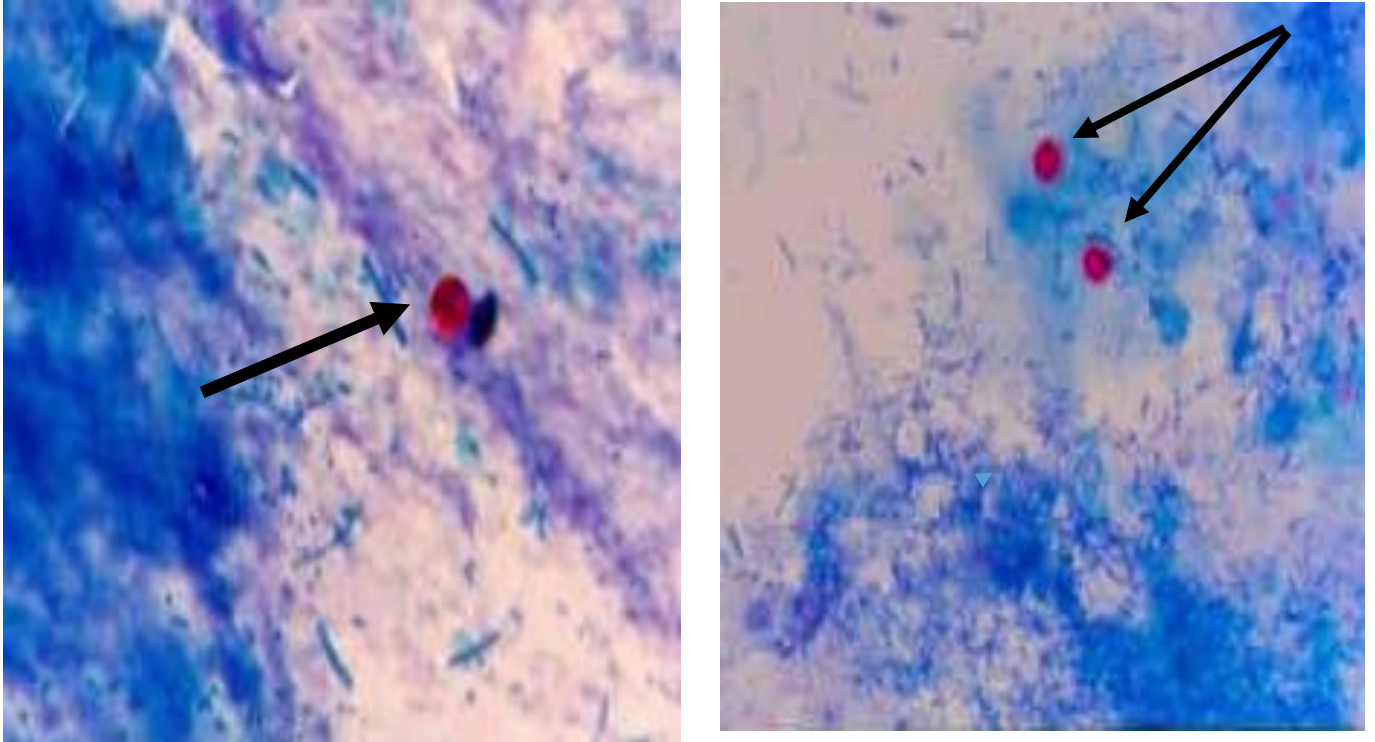
النسبة المئوية (%)	عدد العينات الموجبة	الفحوصات المختبرية
8.1	26	الفحص المجهرية
6.8	22	الفحص المناعي
5.6	18	الفحص الجزيئي
درجات حرية = 2 $P > 0.05$ $X^2=1.562$		



#### 1.2.4: نتائج الدراسة المجهرية Results of the microscopy study

##### 1.1.2.4: نتائج الفحص المجهرى باستعمال الصبغة الحامضية المعدلة.

أوضحت نتائج الفحص المجهرى لعينات الاسهال المأخوذة من براز الانسان والتي تحتوي على أكياس البيض بعد تصبيغها بالصبغة الحامضية المعدلة أن أكياس البيض تكون ذات شكل كروي حمراء اللون مائل للأرجواني أما بقية البراز فيظهر باللون الأزرق وكما موضح بالشكل (1-4)



شكل رقم 1-4: أكياس بيض طفيلي الأبواغ الخبيثة والمعزولة من براز الأنسان بعد تصبيغها بالصبغة الحامضية المعدلة تحت قوة تكبير 100x.

##### 1.1.1.2.4: نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب الجنس

أوضحت نتائج الدراسة الحالية إلى أن الإصابة لدى الذكور تكون مرتفعة مقارنةً مع الإناث إذ بلغت نسبة الإصابة لدى الذكور 10% وبلغت نسبة الإصابة لدى الإناث 6.4% وأكدت نتائج التحليل الإحصائي إلى عدم وجود فروق معنوية بين كلا الجنسين تحت مستوى احتماليه  $P \leq 0.05$  وكما هو موضح بالجدول (2-4).

جدول 4-2: النسب المئوية للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب الجنس.

النسبة المئوية %	العدد المصاب	العدد المفحوص	الجنس
10	15	150	الذكور
6.4	11	170	الإناث
8.1	26	320	المجموع الكلي
درجات حرية = 1 $P > 0.05$ $X^2=1.33$			

#### 2.1.1.2.4: نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب الفئات العمرية .

أشارت نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بين الفئات العمرية 1- 10 سنة بنسبة 14.1% ولم تسجل الدراسة أي إصابة بين الأعمار 31-40 ، إذ أكدت التحاليل الإحصائية إلى وجود فروق معنوية بنسب الإصابة بين الفئات العمرية المدروسة لصالح الأعمار تحت عمر 10 سنوات وتحت مستوى احتمالية  $P \leq 0.05$  وكم موضح بالجدول (4-3).

جدول 4-3: النسب المئوية للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب الفئات العمرية.

النسبة المئوية %	العدد المصاب	العدد المفحوص	الفئات العمرية (سنة)
14.1*	22	155	10 - 1
4	2	50	20 - 11
1.6	1	60	30 - 21
0	0	40	40 - 31
6.6	1	15	50 - 41
8.1	26	320	المجموع الكلي
درجات حرية = 4 $P \leq 0.05$ $X^2=15.719$			

\* وجود فروق معنوية لصالح الفئة العمرية (10-1) سنة تحت مستوى احتمالية  $P \leq 0.05$

#### 3.1.1.2.4: نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة خلال أشهر الدراسة.

أوضحت نتائج الفحص المجهرى بأن نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة خلال أشهر السنة كانت متفاوتة اذ بلغت نسبة الإصابة ذروتها خلال شهر كانون الأول بنسبة 16% وأدنى نسبة كانت في شهر تشرين الأول بنسبة 1.8% وأكدت التحاليل الإحصائية الى وجود فروق معنوية خلال أشهر الدراسة بنسب الإصابة بالطفيلي تحت مستوى احتمال  $P \leq 0.05$  وكما موضح بالجدول (4-4).

جدول 4-4 : النسب المئوية للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة خلال أشهر الدراسة .

النسبة المئوية (%)	العدد المصاب	العدد المفحوص	اشهر الدراسة
8.7	2	23	أيلول 2020
1.8	1	55	تشرين الأول
4.7	2	42	تشرين الثاني
16*	12	75	كانون الأول
9.2	6	65	كانون الثاني 2021
5	3	60	شباط
8.1	26	320	المجموع الكلي
درجات الحرية = 5 $P \leq 0.05$ $X^2=10.699$			

\* وجود فروق معنوية لصالح شهر كانون الأول تحت مستوى احتمالية  $P \leq 0.05$  .

#### 4.1.1.2.4: نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب نوع السكن

أظهرت نتائج الدراسة الحالية إلى أن نسبة الإصابة بالطفيلي كانت أعلى في المناطق الريفية مما في المناطق المدينة ، اذ سجلت نسبة إصابة 12.2% في الريف في حين بلغت نسبة الإصابة في الأشخاص الذين يقطنون المدينة 6.5% اذ أكدت النتائج الإحصائية على أن نسبة الإصابة في الريف كانت أعلى من سكان المدينة وأكدت التحاليل الإحصائية إلى عدم وجود فروق معنوية بين الريف والمدينة تحت مستوى احتمالية  $P \leq 0.05$  وكما موضح بالجدول (4-5).

جدول 4-5 : النسب المئوية للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب نوع السكن.

نسبة مئوية (%)	العدد المصاب	العدد المفحوص	السكن
6.5	15	230	المدينة
12.2	11	90	الريف
8.1	26	320	المجموع الكلي
درجات حرية = 1 $P > 0.05$ $X^2=2.816$			

#### 5.1.1.2.4: نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب مصدر مياه الشرب.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن أعلى نسبة إصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة بحسب تأثير مياه الشرب كانت عند الأشخاص الذين يستعملون مياه الحنفية بنسبة 18.9% وكانت الإصابة بنسبة أقل عند الأشخاص الذين يستخدمون الماء المعقم (RO (Revers osmosis بنسبة 4.8% إذ أكدت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية تحت مستوى احتمالية  $P \leq 0.05$  وكما موضح بالجدول (4-6).

جدول 4-6: نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب مصدر مياه الشرب.

النسبة مئوية (%)	العدد المصاب	العدد المفحوص	مصدر مياه الشرب
18.9 *	14	74	ماء الحنفية
4.8	12	246	ماء الـ RO
8.1	26	320	المجموع الكلي
درجات حرية = 1 $P \leq 0.05$ $X^2=15.024$			

\* وجود فروق معنوية لصالح ماء الحنفية تحت مستوى احتمالية  $P \leq 0.05$ .

#### 6.1.1.2.4: نسبة الإصابة بطفيلي الأبوغ الخبيثة حسب وجود بعض الطفيليات

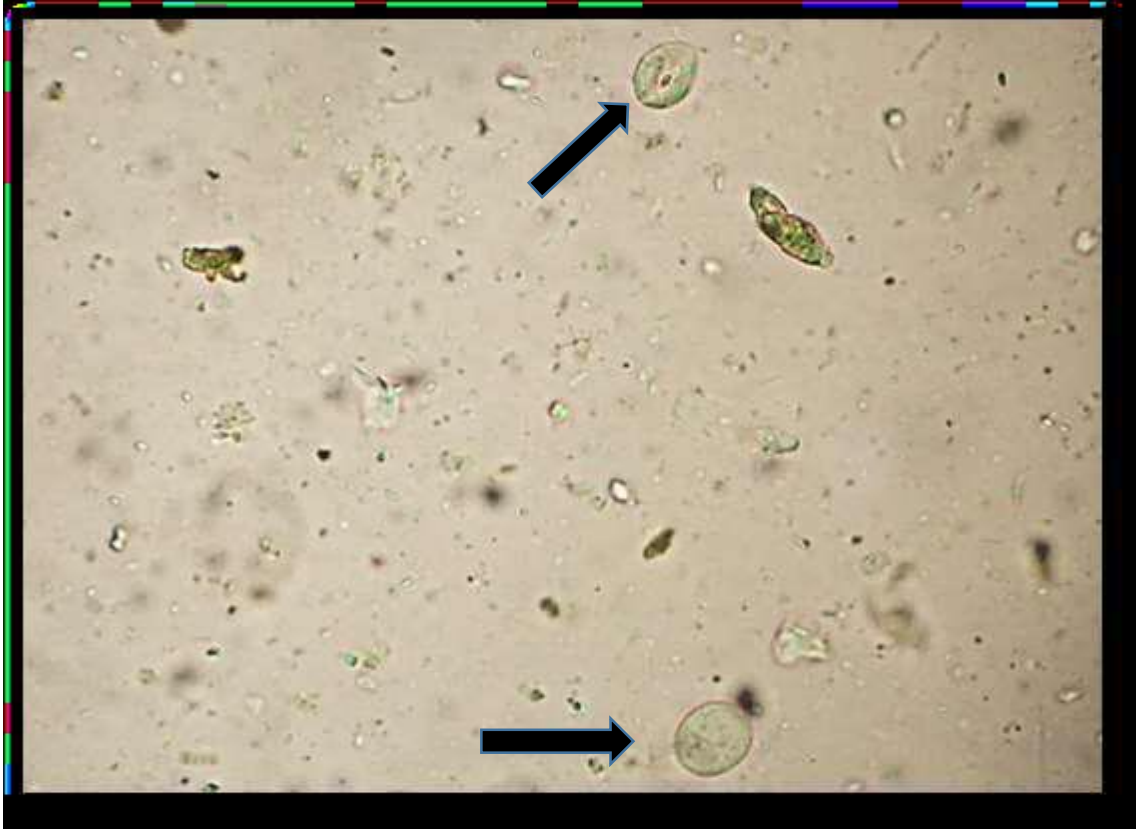
##### المرافقة.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود بعض الطفيليات المرافقة لطفيلي الأبوغ الخبيثة إذ سجلت أعلى نسبة لهذه الطفيليات المرافقة هو طفيلي الأميبا الحالة للنسيج بنسبة 42.3% في حين كانت نسبة الإصابة المرافقة بطفيلي الجيارديا اللامبلية 26.9% وكما موضح بالجدول (4-7) جدول 4-7: النسب المئوية للإصابة بطفيلي الأبوغ الخبيثة حسب الطفيليات المرافقة.

النسبة المئوية (%)	العدد المصاب	الطفيليات المرافقة
42.3	11	طفيلي الأميبا الحالة للنسيج + طفيلي الأبوغ الخبيثة
26.9	7	طفيلي الجيارديا اللامبلية + طفيلي الأبوغ الخبيثة
30.8	8	طفيلي الأبوغ الخبيثة فقط
8.1	26	المجموع الكلي
درجات حرية 1 $P > 0.05$ $X^2 = 0.23$		

#### 2.1.2.4: نتائج الفحص المجهرى باستخدام طريقة التطويق

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنه يمكن الحصول على أكياس البيض لطفيلي الأبوغ الخبيثة عن طريق استعمال طريقة التطويق بمحلول شيدر السكري إذ ظهرت أكياس البيض شفافة وذات شكل كروي تحتوي على جدران غامقة إذ تم حفظ أكياس البيض في أنابيب نظيفة حاوية على قطرات من ثنائي كرومات البوتاسيوم لحين استخدامها ، كما في شكل (4-2) وأكدت نتائج الفحص المجهرى باستخدام المحلول السكري بطريقة التطويق إلى أن نسب الإصابة بطفيلي الأبوغ الخبيثة بلغت 6.25% أي بواقع 20 عينة مصابة من أصل المجموع الكلي للعينات والبالغ 320 عينة.



شكل 4-2: مسحة رطبة لإيكياس بيض طفيلي الأبواغ الخبيثة المعزولة من براز الإنسان بطريقة التطويق بمحلول شيدر السكري بعد فحصها بقوة X100

#### 2.2.4: نتائج الفحص المناعي الكروماتوكرافي

تم اجراء الدراسة الحالية على 320 عينة من براز الأشخاص المصابين بالإسهال و20 عينة من براز الأشخاص السليمين والتي تعرف بعينات السيطرة لغرض إجراء الاختبار المناعي الكروماتوكرافي وتأكيد نتائج الفحص المجهرى باستعمال عدة الاختبار (Cer test crypto) والتي تستهدف الكشف عن الأضداد في عينات البراز وأتضح في ضوء نتائج هذه العدة اعتماداً على الخط المؤشر في شريط عدة الأختبار أن 22 عينة من عينات الاسهال كانت موجبة في حين لم تظهر أي إصابة في عينات السيطرة، وكانت نسبة الإصابة بالاختبار المناعي أعلى من نسبة الإصابة بالفحص المجهرى وبلغت نسبة الفحص المناعي 6.8 % إذ ظهرت عينات سالبة بالفحص المجهرى ولكن أتضح أنها عينات مصابة بالطفيلي عندما اجري عليها الفحص المناعي .



(A) Positive



(B) Negative

شكل رقم 4-3: تشخيص طفيلي الأبواغ الخبيثة باستخدام طريقة الفحص المناعي الكروماتوغرافي

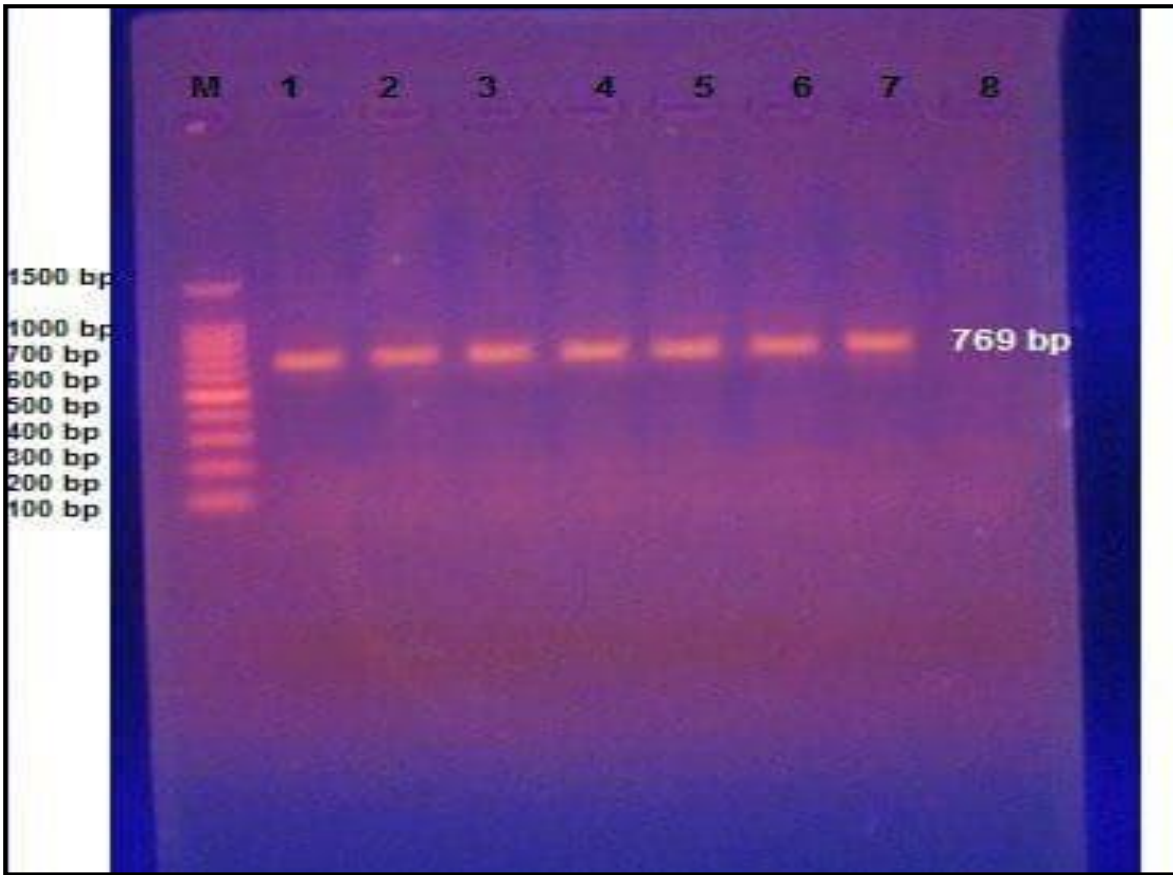
### Molecular study

### 3.2.4 : الدراسة الجزيئية

#### 1.3.2.4: نتائج الدراسة الجزيئية باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل

### Polymerase Chain Reaction (PCR)

لغرض تأكيد النتائج التي ظهرت في الدراسة المجهرية والمناعية فقد أستعملت الدراسة الجزيئية للكشف عن نسبة الإصابة بطفيلي الابواغ الخبيثة والتي اعتمدت على تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للكشف عن جين بروتين جدار البيض (COWP) Cell Outer Wall Protein ، اذ تم تضخيم الحامض النووي باستخدام بادئات محددة وتم أنجاز التفاعل باستخدام جهاز المدور الحراري وتحت الظروف المثلى ، أظهرت النتائج عن وجود حزمة واحدة ( Singal band ) في هلام الاكاروز ( Agarose gel ) ذات وزن جزيئي 769 زوجاً من القواعد النيتروجينية (base pairs) في الدنا المستخلص من عينات براز الأشخاص المصابين بداء الأبواغ الخبيثة وهي دلالة على إصابة المريض بالطفيلي ، على النقيض من ذلك لم تظهر الحزمة في عينات الدنا المستخلص من الأشخاص غير مصابين بطفيلي الابواغ الخبيثة أو ما يسمى بعينات السيطرة وهي دلالة على عدم اصابتهم بالطفيلي وأكدت التحاليل الإحصائية ان الإصابة بطفيلي الابواغ الخبيثة في الدراسة الحالية بلغت 5.6 % وكما موضح بالشكل (4-4).



شكل رقم 4-4: الترحيل الكهربائي لنتائج تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل ( PCR Product ) لجين طفيلي الأبواغ الخبيثة (*Cryptosporidium parvum COWP gene*) على هلام الاكاروز بفرق جهد 70 فولت ولمدة 1.5 ساعة وبأستعمال صبغة بروميد الأثديوم . اذ تظهر بعض العينات حزمة بحجم 769 زوج من القواعد النيتروجينية وهي دلالة على وجود دنا الطفيلي . المسار M : DNA lader ، المسارات من 1-7 : دنا معزول من براز مرضى الاسهال بسبب داء الأبواغ الخبيثة ( تظهر فيه الحزمة ) المسار رقم 8 : دنا معزول براز الأشخاص غير المصابين بالإسهال وتعرف بعينات السيطرة.

#### 2.3.2.4: نتائج الدراسة الجزيئية باستخدام تفاعل البلمرة المتداخل Nested PCR

يتم في هذه المرحلة تحليل النمط الجيني للجين *COWP* بواسطة استخدام نوعين من البادئات المحددة في التفاعل (*COWP F* و *COWP R*) إذ تم تضخيم الحامض النووي باستخدام بادئات محددة وتم أنجاز التفاعل باستخدام جهاز المدور الحراري وتحت الظروف المثلى ، أظهرت النتائج عن وجود حزمة واحدة في هلام الاكاروز ذات وزن جزيئي 553 زوجاً من القواعد النيتروجينية في الدنا المستخلص من عينات براز الأشخاص المصابين بداء الأبواغ الخبيثة ، وهي دلالة على إصابة المريض بالطفيلي ، على النقيض من ذلك لم تظهر الحزمة في عينات الدنا المستخلص من الأشخاص غير مصابين بطفيلي الابواغ الخبيثة أو ما يسمى بعينات السيطرة وهي دلالة على عدم اصابتهم



بالطفيلي وأكدت التحاليل الإحصائية ان الإصابة بطفيلي الابواغ الخبيثة في الدراسة الحالية بلغت 5.6 % وكما موضح بالشكل (4-5).



شكل رقم 4- 5: الترحيل الكهربائي لنتائج تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل المتداخل ( Nested PCR Product ) لجين طفيلي الأبواغ الخبيثة *Cryptosporidium parvum* (*COWP* gene) على هلام الاكاروز بفرق جهد 70 فولت ولمدة 1.5 ساعة وبأستعمال صبغة بروميد الأنيديوم . اذ تظهر بعض العينات حزمة بحجم 553 زوج من القواعد النيتروجينية وهي دلالة على وجود دنا الطفيلي . المسار M : DNA lader ، المسارات من 1-7 : دنا معزول من براز مرضى الاسهال بسبب داء الأبواغ الخبيثة ( تظهر فيه الحزمة ) المسار رقم 8: دنا معزول براز الأشخاص غير المصابين بالإسهال وتعرف بعينات السيطرة.

1.4.2.4: الحساسية والنوعية بين الفحص المجهري والفحص المناعي.

جدول 4-8: يوضح الحساسية والنوعية بين الفحص المجهري والفحص المناعي.

المجموع	الفحص المناعي			
	كلا	نعم		
26	(b) = 6 الموجب الكاذب	(a) = 20 الموجب الحقيقي	نعم	الفحص المجهري
294	(d) 292 السالب الحقيقي	(c) = 2 السالب الكاذب	كلا	
320	198	22	Total	

$$100 \times \frac{\text{الموجب الحقيقي}}{\text{الموجب الحقيقي} + \text{السالب الكاذب}} = \text{الحساسية}$$

$$90\% = 100 \times \frac{20}{2+20} = \text{الحساسية}$$

$$100 \times \frac{\text{السالب الحقيقي}}{\text{السالب الحقيقي} + \text{الموجب الكاذب}} = \text{النوعية}$$

$$97\% = \frac{292}{6+292} = \text{النوعية}$$

#### 2.4.2.4: الحساسية والنوعية بين الفحص الجهري والفحص الجزيئي.

جدول 4-9: الحساسية والنوعية بين الفحص المجهرى والفحص المناعي .

Total	PCR			
	كلا	نعم		
26	(b) = 14 الموجب الكاذب	(a) = 12 الموجب الحقيقي	نعم	الفحص المجهرى
	(d) 290 السالب الحقيقي	(c) = 4 السالب الكاذب	كلا	
320	204	16	Total	

$$100 \times \frac{\text{الموجب الحقيقي}}{\text{الموجب الحقيقي} + \text{السالب الكاذب}} = \text{الحساسية}$$

$$75\% = 100 \times \frac{12}{4+12} = \text{الحساسية}$$

$$100 \times \frac{\text{السالب الحقيقي}}{\text{السالب الحقيقي} + \text{الموجب الكاذب}} = \text{النوعية}$$

$$95\% = 100 \times \frac{290}{14+290} = \text{النوعية}$$

3.4.2.4: الحساسية والنوعية بين الفحص المناعي والفحص الجزيئي

جدول 4-10: يوضح الحساسية والنوعية بين الفحص المناعي والفحص الجزيئي.

Total	PCR			
	كلا	نعم		
22	(b) = 6 الموجب الكاذب	(a) = 16 الموجب الحقيقي	نعم	الفحص المناعي
	(d) 296 السالب الحقيقي	(c) = 2 السالب الكاذب	كلا	
320	302	18	Total	

$$100 \times \frac{\text{الموجب الحقيقي}}{\text{الموجب الحقيقي} + \text{السالب الكاذب}} = \text{الحساسية}$$

$$88\% = 100 \times \frac{16}{2+16} = \text{الحساسية}$$

$$100 \times \frac{\text{السالب الحقيقي}}{\text{السالب الحقيقي} + \text{الموجب الكاذب}} = \text{النوعية}$$

$$98\% = 100 \times \frac{296}{6+296} = \text{النوعية}$$

الفصل الخامس

المناقشة

**Discussion**

## الفصل الخامس

### المناقشة Discussion

#### 1.5: نسبة الإصابة بداء الأبواغ الخبيثة

يعد أنتشار الطفيليات المعوية وبضمنها طفيلي الابواغ الخبيثة بين السكان من المشاكل الصحية الكبيرة التي يجري التحري عنها بإجراء المسوحات في المستشفيات والمدن والمدارس اذ تنتشر هذه الطفيليات بين مختلف الاعمار وفي جميع المناطق الحضرية والريفية التي توفر البيئة الملائمة لانتقال هذه الطفيليات (Chin,2000) ويعزى الانتقال العالي والاصابة بهذه الطفيليات الى سهولة انتقال الأطوار المعديّة لهذه الطفيليات من شخص لأخر عن طريق المياه أو الأطعمة الملوثة وتختلف مصادر التعرض للإصابة بهذه الطفيليات اعتماداً على الثقافة الصحية والعادات الاجتماعية وطريقة التعايش مع الحيوانات ونوعية التغذية ، وكذلك تزداد الإصابة ببعض الطفيليات بسبب ما يعرف بالإصابة الانتهازية (Opportunistic infection) لاسيما عندما تكون الحالة المناعية منخفضة لدى الشخص المصاب لاسيما في المرضى متلقي العلاج الكيميائي ومرضى الايدز (Chin,2000)

يعد طفيلي الأبواغ الخبيثة من أشهر الطفيليات المعوية المنتقلة عن طريق المياه والطعام الملوث بأكياس بيض الطفيلي إذ يشكل الطفيلي مشكلة صحية كبيرة في العديد من البلدان النامية وغير النامية ، ويرجع ذلك في الغالب إلى سوء الصرف الصحي وعدم كفاية النظافة الشخصية (Sayyari et al. 2005). إن نسبة الإصابة بطفيلي الابواغ الخبيثة المسجلة في الدراسة الحالية هي أقل من تلك المسجلة في العديد من الدراسات السابقة في العراق مثل دراسة (Al-Mosa (2002) في محافظة بابل اذ بلغت نسبة الاصابة بالطفيلي 44.1 %، وكشفت دراسة (Mahmud et al. (2007) في محافظة واسط عن نسبة إصابة بالطفيلي بلغت 34.6 % ، وكذلك دراسة (Jaeffer (2011) في محافظة بغداد بنسبة إصابة 22% . علاوة على ذلك فإن نسبة الإصابة في الدراسة الحالية أقل من تلك المسجلة في دراسات أخرى في دول حول العالم مثل دراسة (Tinuade et al. (2006) في نيجيريا بنسبة 23% ودراسة (Nagosso et al. (2015) في تنزانيا بنسبة 29.6% . في حين أن نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة المسجلة في الدراسة الحالية أعلى من النسبة المسجلة في بعض الدراسات مثل (Al-Taie (1997) في محافظة ديالى بنسبة 2.8% و(Alousi et al. (2003) في مدينة الموصل .

قد يرجع الاختلاف في النسبة الإجمالية للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة في الدراسة الحالية والدراسات السابقة إلى عدة أسباب منها على سبيل المثال الاختلاف في نوع عينة الدراسة ، فبعض الدراسات معنية بالأطفال والبعض الآخر لكل الأعمار، كما أن الأختلاف بين الظروف البيئية والمناخية في مناطق الدراسة فضلاً عن وجود أو عدم وجود بعض الحيوانات التي تعد مستودعات للعديد من الطفيليات وكذلك حجم العينة وطريقة الفحص يؤثر أيضاً على نسبة الإصابة بالإضافة إلى بعض الدراسات التي تشمل غير الطفيليات الأخرى مثل البكتيريا والفيروسات ، وجميع هذه العوامل تؤثر على نسب الإصابة بهذا الطفيلي (Nunez et Schmidt & Roberts, 2000) (Ansari et al., 2012; Samie et al., 2009 ; al., 2003).

## 2.5: نسبة الإصابة بطفيلي الابواغ الخبيثة حسب طريقة الفحص

أظهرت الدراسة الحالية لتشخيص الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة عن طريق استخدام ثلاث طرائق تشخيصية وهي المجهرية والمناعية والجزئية أن أعلى نسبة إصابة تم تشخيصها هي بطريقة الصبغة الحامضية المعدلة بنسبة 8.1% و أقل منها كانت في كل من الطريقة المناعية الكروماتوغرافية بنسبة 6.8% والطريقة الجزئية بنسبة 5.6% وكما موضح في جدول النتائج (1-4) ، تتفق هذه الدراسة مع دراسة (Mahdi & Ali (2002 في محافظة البصرة أذ وجدت أعلى نسبة إصابة تم تشخيصها بطريقة الصبغة الحامضية المعدلة 5%، فضلاً عن دراسة (Saneian et al. (2010) إذ وجد ان أعلى نسبة إصابة تم تشخيصها بطريقة الصبغة الحامضية المعدلة 4.6% في مدينة أصفهان/ إيران ، ووجد (Olewi (2015 ان أعلى نسبة إصابة تم تشخيصها بطريقة التصيغ السريع الحمضي بنسبة 3.7% في محافظة بابل. وكذلك (Al-Yassaree (2004 وجد أعلى نسبة إصابة تم تشخيصها بطريقة الصبغة الحامضية المعدلة بنسبة 5.5% في محافظة بابل. وكما وجد (Al-warid et al. (2010 في شمال بغداد و (Jomah & Mallah (2016 في محافظة السماوة أن أعلى نسبة الإصابة بالطفيلي التي تم تشخيصها بطريقة الصبغة الحامضية المعدلة تساوي 14.78% و 21% على التوالي ، في حين وجد (Al-Shahery & Hasan (2007 أن نسبة الإصابة في مدينة الموصل كانت 36.6% وقد تضمنت نتائج دراسة اخرى اختبار 115 عينة مأخوذة من أطفال في محافظة الرمادي تبين أن النسبة الكلية للإصابة بالطفيلي بلغت 39.13% (Mohanad, 2008).

وكما وجد (Abdul Sadah et al. (2013 أن نسبة الإصابة في مدينة الكوت كانت 33.83% بطريقة الصبغة الحامضية المعدلة ، وكما أظهرت دراسات أخرى اعتمدت على طريقة الصبغة الحامضية المعدلة في بنغلاديش والهند والعراق والكويت وطاجيكستان والإمارات العربية

المتحدة واليمن أن أعلى نسبة مئوية للإصابة بطفيلي الأبوغ الخبيثة كانت 77% ، 11.8% ، 33.83% ، 41.4% ، 63.1% ، 19.4% و 43.4% على التوالي (Korpe et al., 2016). إذ يمكن مقارنة هذا الانتشار بالدراسات السابقة الواردة من كندا (18.02%) والولايات المتحدة الأمريكية (21.2%) وأستراليا (23.8%) ونيوزيلندا (86.4%) (Jullien et al.2019). كذلك دراسة (Abdel-messiah et al. (2007) في مصر إذ وجد ان نسبة الإصابة بطفيلي الأبوغ الخبيثة بأستعمال الطريقة الحامضية المعدلة بلغت 17%.

تعد طريقة الصبغة الحامضية المعدلة الأكثر شيوعاً في تشخيص طفيلي الأبوغ الخبيثة بسبب عدة عوامل مثل سهولة التطبيق ، والتكلفة المنخفضة (Morgan et al.1998). ، على الرغم من أن طريقة الصبغة الحامضية المعدلة كانت تستخدم على نطاق واسع إلا أن طرائق الكشف المناعية والجزئية استخدمت بشكل كبير للكشف عن طفيلي الأبوغ الخبيثة إذ ان فحوصات الكشف عن المستضد مثل اختبار طريقة الفحص المناعية الكروماترافية أستخدمت بشكل كبير لتشخيص طفيلي الأبوغ الخبيثة (Kosek et al., 2001) وذلك بسبب حساسيتها العالية ودقتها في التشخيص والسرعة في تنفيذ الاختبار إذ يمكنها اكتشاف 100 كيس بيض في عينة حجمها 1 مل من البراز (Clark, 1999). يتطلب تشخيص الإصابة بشكل عام والتعرف على المرحلة المعدية للطفيلي وهي أكياس البيض ، والتي عادة ما يكون حجمها 4-6 مايكرومتر. وتستخدم تقنية الصبغة الحامضية المعدلة للكشف عن أكياس البيض التي تكون ذات حجم صغير (Casemore,1990).

يصبح اكتشاف أكياس البيض أكثر صعوبة في المرضى الذين لا يعانون من أعراض أو المرضى الذين يعانون من أعراض طفيفة حتى باستخدام تقنيات التصبغ الحامضي المعدل (Cole et al., 1999). ويتميز الفحص الجزيئي بأنه الاختبار الأمثل للكشف عن طفيلي الأبوغ الخبيثة (Coupe et al.,2005). إذ يتميز الفحص الجزيئي بكونه أقل استهلاكاً للوقت وأسهل في التنفيذ (Trisha et al.,2012). وبمقارنة الفحص المجهرى والفحص الجزيئي ، نجد أن الفحص المجهرى لأكياس البيض ليست طريقة تشخيصية مناسبة يتم إجراؤها على عينات البشر بسبب قلة عدد أكياس البيض و كما أن عزل الكائن الحي عن الأنسجة الأخرى يعد إجراءً صعباً ويستغرق وقتاً طويلاً ، وبالتالي فإن الطريقة الجزيئية ممكنة لتشخيص العوامل بسرعة ودقة عالية لتحديد الأنواع الفرعية والأهم من ذلك لتحديد المصدر والعوامل التي تساعد على الإصابة (Ramirez et al., 2004). تبلغ حساسية الأختبار الجزيئي حوالي 20 كيس بيض في 1 مل من عينة البراز (Lindergard et al.,2003). فضلاً عن ذلك ، يعد تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل



أفضل تشخيص لطفي الأبوغ الخبيثة لأن الفحص المجهرى يكون غير فعال لاسيما إذا كانت أكياس البيض قليلة في عينة البراز ولكن المريض لا يزال يعاني من العدوى. يسمح PCR كطريقة جزيئية بالتمييز بين الأنواع ,على الرغم من كونها طريقة سريعة وموثوقة وحساسة ، إلا أن لها بعض القيود التي تؤدي إلى ظهور نتائج إيجابية خاطئة بسبب التلوث المختبري (Fayer et al.,2000).

علاوة على ذلك ، قد يعطي الفحص المجهرى و تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل نتائج مختلفة لأن بعض أكياس البيض قد تتلف قبل استخلاص الحمض النووي أثناء الطريقة الأخيرة ( Amar et al.,2004 ؛ Magi et al.,2006). فضلاً عن ذلك، تبين أن تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخلة أكثر حساسية بأربع إلى خمس مرات من تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل البسيط (Kato et al., 2003).

## 1.2.5: نتائج الفحص المجهرى باستخدام الصبغة الحامضية المعدلة

### 1.1.2.5: الإصابة بطفي الأبوغ الخبيثة حسب الجنس

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة إصابة بطفي الأبوغ الخبيثة في محافظة كربلاء لدى الذكور بنسبة 10% بينما كانت الأقل عند الإناث إذ كانت بنسبة 6.4% ، باستخدام طريقة الصبغة الحامضية المعدلة وكما موضح (جدول 4-2) إذ تطابقت هذه الدراسة مع الدراسات ،الكلابي ( 1999 ) ، معل ( 2008 ) ، حسين (2011) كذلك وجدت دراسة (Olewi 2015) في محافظة بابل أن نسبة الإصابة عند الذكور 2.6% و 1.1% عند الإناث ، وكذلك أجريت دراسة في فلسطين وجدت أن نسبة الإصابة عند الذكور كانت 11.3% و 9.7% عند الإناث (Yacoub, 2014). لكنها اختلفت مع دراسات (Al- Hindi et al.,(2007) , Ali et al, ( 2011) ، الشباني (2014) ، الجعفري (2019) ، وكذلك وجدت دراسة (Saneian et al. (2010) ، في مدينة أصفهان / إيران أن النسب المئوية للإصابة بطفي الأبوغ الخبيثة كانت 2% و 2.6% في الذكور والإناث على التوالي . وفي محافظة القادسية ، (Mohammad 2018) أن نسبة الإصابة بين الإناث 56.6% كانت أعلى من الذكور 43.3%.

قد يرجع السبب في اختلاف نسبة الإصابة بين الذكور والإناث الى عدة عوامل منها اختلاف نوعية التغذية وكذلك يكون الذكور أكثر نشاطاً من الإناث ، ولأنهم على اتصال مع عوامل البيئة الخارجية التي تلعب دوراً في انتقال أكياس بيض الطفيلي وكونهم في مجموعة عمل في المجتمعات هذا مما يجعلهم أكثر عرضة للإصابة و تعرض الذكور الى التلوث أكثر من الإناث بسبب تناولهم

الأطعمة المكشوفة في الأماكن العامة أو من الباعة الجوالين. فضلاً عن طبيعة الأراكيل وقلة الاهتمام بالنظافة الشخصية وغسل اليدين مما يزيد من فرص الإصابة بالطفيلي وعدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين الذكور والإناث يمكن أن يكون بسبب قابلية النقل وإمتلاك نفس الفرصة للإصابة بالطفيليات المعوية لكلا الجنسين (AL-Mamouri, 2000).

### 2.1.2.5: الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب الفئات العمرية.

أكدت نتائج الدراسة الحالية أن طفيلي الأبواغ الخبيثة يصيب كافة الفئات العمرية بنسب مختلفة ومن كلا الجنسين، وأظهرت الدراسة أن أعلى نسبة أصابه بين الفئات العمرية كانت لدى الأطفال بعمر 1-10 سنة إذ بلغت النسبة 14.1% وكانت ادنى نسبة أصابة بين الفئات العمرية 21-30 سنة إذ بلغت 1.6% ويعود السبب في ارتفاع نسبة الإصابة عند الأطفال الى قلة الوعي الصحي وعدم الاهتمام بالنظافة الصحية والتواجد في الأماكن الملوثة وعدم غسل اليدين قبل تناول الطعام واللعب بالأدوات الملوثة بأكياس البيض فضلاً الى عدم اكتمال الجهاز المناعي لديهم وكذلك يمكن ان تحدث الإصابة بمجرد ابتلاع جرعة قليلة من اكياس البيض كل هذه العوامل ساعدت على انتشار الطفيلي عند الأطفال (Areeshi et al.,2007).

توافقت هذه الدراسة مع العديد من دراسات الباحثين الذين أكدوا على أنتشار الطفيلي عند الأطفال دون سن العاشرة من العمر ومنهم (Al-Gelany (2003) إذا وجد ارتفاع نسبة الأصابة عند الأطفال الذين تتراوح أعمارهم من 1-8 سنوات فضلاً عن دراسات العديد من الباحثين الذين أكدوا على ارتفاع نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة عند الأطفال (Das et al. (2000) ; Othman (2000) ; Palit et al.(2005) ; al.(2006) وكذلك توافقت مع (Akyon et al. (1999) في تركيا إذ أشاروا إلى أن ارتفاع النسبة المئوية لداء خفيات الأبواغ كانت في الفئة العمرية أقل من 12 عامًا وفي محافظة ديالى وجد (Al-Kaisy & Sultan (2008) أن أعلى نسبة إصابة في الفئة العمرية بعمر سنة بينما وجد (Jaaffer (2011) في محافظة بغداد أعلى نسبة إصابة في الفئات العمرية 4-6 سنوات وبينت دراسة أخرى مثل دراسة (Waldron et al. (2011) في أستراليا أن داء خفيات الابواغ كان الأعلى في الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين 1-4 سنوات و أظهرت دراسات سابقة أجريت في بلدان استوائية مختلفة أن الأطفال الذين تقل أعمارهم عن سنتين هم الأكثر عرضة للإصابة بطفيلي الابواغ الخبيثة إذ تتراوح النسب المئوية المبلغ عنها من 18.9% في جنوب الهند (Xiao et al.,2001). فضلاً عن ذلك ، كانت نتائج الدراسة الحالية لا تتفق مع نتائج (Mbanugom & Agu (2006) الذين أبلغوا عن أن نسبة الإصابة كانت 14.0% بين الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين 3 أشهر و 15 عامًا في نيجيريا

وكذلك نتائج الباحث (AL-Ezzy *et al.* (2017) الذين وجدوا أن طفيلي الأبوغ الخبيثة يصيب في الغالب الأطفال دون سن الخامسة في محافظة ديالى.

وأكدت دراسة أخرى في مستشفيات الكويت قام بها (Iqbal *et al.* (2011) الذي وجد أن حالات داء خفيات الأبوغ كانت الأعلى لدى الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين 4-8 سنوات كانت 41% ، بينما أكدت دراسة في إيران شملت عينات البراز التي تم جمعها من 104 من الأطفال وبالغين المصابين بالتهاب المعدة والأمعاء ، أفادت الدراسة أن نسبة الإصابة بطفيلي الأبوغ الخبيثة كانت 12% (Nahrevanian *et al.*, 2010). وبينت دراسات أخرى مثل-Abdel (2007) Messih في القاهرة / مصر حيث كانت أعلى نسبة إصابة 88.8% للفئة العمرية ما بين سنة إلى سنتين. في فلسطين وجدت دراسة (Abu-Alrub (2008) أن أعلى معدل لانتشار لطفيلي الأبوغ الخبيثة كان في الأطفال بين يوم واحد وخمس سنوات (14.4%) ، وكما سجلت الدراسة نسبة إصابه عند الفئات العمرية 11-20 سنة ، 21-30 سنة ، 31-40 سنة متوافقة مع ماسجلته دراسات عدد من الباحثين ومنهم (Al-Warid (2010) الذي سجل نسبة إصابة بالطفيلي عند نفس الفئات العمرية بنسب 7.33% ، 11% ، 10.09% على التوالي ، ودراسة (Kia *et al.* (2008) الذي لاحظ أن الطفيلي يصيب كلا الجنسين وبمختلف الأعمار أما الفئات العمرية من (41-50) فقد تطابقت نتائج الدراسة مع دراسة عدد من الباحثين ومنهم (Baqai *et al.*(2005).

### 3.1.2.5: الإصابة بطفيلي الأبوغ الخبيثة خلال أشهر الدراسة .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة أجمالية للإصابة كانت في شهر كانون الأول بنسبة 16% بينما سجلت أقل نسبة للإصابة في شهر تشرين الأول 1.8% كانت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع نتائج (Iqbal *et al.* (2001) ؛ Gatei *et al.*(2006) ; Al Rikabi (2012) الذين أشارو الى أن سبب انتشار طفيلي الأبوغ الخبيثة في فصل الشتاء يعود الى أن مياه الأمطار التي تقوم بجرف التربة الملوثة بفضلات الحيوانات الحاوية على أكياس البيض واختلاطها مع مياه الجداول والأنهار مما يساعد على أنتشار الطفيلي (Raheem,2012). إذ أستطاع (Hussein (2011) أن يوضح أن النسبة العالية للإصابة بمرض الأبوغ الخبيثة في أشهر الشتاء ترجع إلى توفر الظروف مناسبة من درجات الحرارة والرطوبة وطبيعة المناخ في العراق من الأسباب التي قد تؤدي إلى زيادة أنتشار هذا الطفيلي زيادة عدد الحشرات في شهور درجات الحرارة الرطبة والمتوسطة من السنة إذ تكون الحشرات أحد النواقل الميكانيكية لهذا الطفيلي ، ولاسيما الذباب ، واختلفت هذه الدراسة مع ما سجله (Amin (2000) ; Mahgoub *et al.* (2004) الكعبي ; (2006) الشباني(2014) ; (Al-Baldawy (2017) الذين أشارو الى أنتشار الطفيلي في فصل

الصيف يعود الى عدة عوامل منها السباحة في الأنهار والجداول الملوثة بأكياس البيض في الأيام الحارة كما أن حرارة ورطوبة الجو لها دور في سهولة انتقال أكياس البيض فضلاً عن ذلك ، تفاوت انتشار خفيات الأبواغ في البشر من بلد لآخر ، وحتى بين المناطق المختلفة من نفس البلد بسبب الاختلافات بين النسب المئوية للإصابة والظروف الاجتماعية والاقتصادية ، وتلوث المياه والغذاء ، والنظافة العامة (Fayer,2010; Jex & Gasser 2010).

#### 4.1.2.5: الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب نوع السكن

أوضحت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة في محافظة كربلاء كانت في المناطق الريفية أعلى من نسبة الإصابة في مناطق المدينة إذ بلغت نسبة الإصابة في مناطق الريف 12.2% وبلغت نسبة الإصابة في مناطق المدينة 6.5% ويعود السبب في ارتفاع نسبة الإصابة في مناطق الريف الى مجموعة من العوامل المحيطة بالمصابين منها أن مناطق الريف تكثر فيها تربية الحيوانات والتماس المباشر معها والتعامل المباشر مع فضلاتها في تسميد المزروعات فضلاً عن السباحة في الجداول والأنهار والتغوط في الأماكن العامة واستعمال مياه الأنهار بصورة مباشرة للشرب والطهي وتنظيف الأدوات المنزلية فضلاً عن ذلك وجود الحشرات ورطوبة التربة فضلاً عن انخفاض المستوى الصحي والثقافي وعدم تشخيص الإصابة بالأمراض بصورة صحيحة ونقص في عدد المستشفيات والمراكز الصحية إذ ساعدت هذه العوامل في ارتفاع نسبة الإصابة في مناطق الريف (Othman, 2000).

تتفق هذه الدراسة مع دراسة Korea Chai *et al.* (1996) إذ سجلت نسبة إصابة أعلى في الريف 14% و 3.7% في المناطق الحضرية. كذلك (Al- Taie & Al-Mosa (2006) وجد في محافظة بابل 64.7% في الريف و 35.3% في الحضر ودراسة (Oleiwi (2015) الذي سجل أعلى نسبة إصابة في الريف 5.1% وأقل نسبة إصابة في المناطق الحضرية كان 2.8% في محافظة بابل وأيضاً وجد في محافظة بغداد (AL-Kubaisy *et al.* (2014) أعلى نسبة إصابة في الريف بلغت 50.9% و 13.4% في المدينة ووجدت نتائج دراسة (Mohanad (2008) في فلسطين أعلى نسبة إصابة في الريف 12.6% و 3.6% في المناطق الحضرية، إذ قامت دراسة أخرى بمحافظة القادسية من قبل الباحث (Mohammad (2018) وجدت أن نسبة الإصابة في الريف 63.3% مقارنة بالحضر 36.6% وكذلك دراسة حسين (2011) و Al-Baldawy (2017) حيث بينت أن نسبة الإصابة في منطقة الريف أعلى من منطقة الحضر 14.13% و 12.50% على التوالي في محافظة النجف . ولكن اختلفت نتائج هذه الدراسة مع (Al- Yassaree ، حيث بين أن نسبة الإصابة بين المدينة والريف لاتشكل فرقا معنويا اعتمادا على أن

بعض سكان الريف الذين يستعملون مياه شرب معقمة فضلاً عن الاهتمام بالنظافة الشخصية وامتلاكهم مستوى صحي وثقافي عالي.

#### 5.1.2.5: الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة حسب مصدر مياه الشرب

يعد طفيلي الأبواغ الخبيثة من الطفيليات التي تنتقل عن طريق الماء ويصيب الخلايا الظهارية المبطنة للأمعاء الدقيقة للإنسان (Fayer,2010). لهذا تلعب مصادر المياه دور كبير في الإصابة بهذا الطفيلي اذ يعد الماء الناقل الرئيس لأكياس بيض الطفيلي ويشكل الماء خطراً كبيراً على صحة الحيوان والإنسان اذ سجلت في بعض الدول حالات وبائية كبيرة للإصابة بهذا الطفيلي كان سببها الماء (WHO,2009) وأوضحت الدراسة الحالية أن نسبة الإصابة بهذا الطفيلي كانت أعلى عند الأشخاص الذين يعتمدون في شربهم على ماء الحنفية إذ بلغت النسبة 18.9% في حين كانت نسبة الإصابة أقل عند الأشخاص الذين يشربون مياه المعقمة 16.2% .

توافقت هذه الدراسة مع ( Al – warid (2010) الذي أكد على تواجد الطفيلي بنسبة 16.57% في ماء الحنفية ، ومعل (2008) سجلت تواجد الطفيلي بنسبة 5.3% في مياه الاسالة ، اذ أن أكياس بيض الطفيلي تتواجد بكميات كبيرة في مياه الاسالة ويعود السبب في ذلك الى مقاومة أكياس بيض الطفيلي للعديد من المعقمات والمطهرات المستعملة لتعقيم مياه الشرب إضافة الى صغر حجم اكياس البيض ( بدير ، 2007). وكذلك النقص في مياه الشرب يمكن أن يسبب تجمع لأكياس البيض وانتقالها الى الإنسان وبالتالي حدوث الإصابة وخاصة عند الأطفال (Unicef,2007).

#### 6.1.2.5: الإصابة بطفيلي الابواغ الخبيثة حسب وجود بعض الطفيليات المرافقة.

تعد الطفيليات المرافقة لطفيلي الأبواغ الخبيثة لاسيما الأميبا الحالة للنسيج والجيارديا اللامبلية من الطفيليات المعوية التي تنتقل الى الإنسان عن طريق تناول المشروبات والأطعمة الملوثة بأحد أطوار الطفيلي أو التماس المباشر مع الحيوانات المصابة وكذلك اكتظاظ المناطق السكنية واختلاط المصابين مع الاصحاء وضعف الجهاز المناعي اذ توافقت هذه الدراسة مع عدد من الباحثين الذين أكدوا على وجود طفيليات مرافقة مع طفيلي الأبواغ الخبيثة ومنهم (Ballani et al.(2012) ; Li- Guang et al.(2012) ولكن اختلفت هذه الدراسة مع باحثين آخرين أشاروا الى عدم وجود طفيليات مرافقة (Jarallah(2012);Sayyari et al. (2005). قد يكون الاختلاف في النسب المثوية للإصابة الطفيلية المختلطة من دراسة إلى أخرى يعود الى مجموعة متنوعة من العوامل بما في ذلك انتقال المضيف ، والديموغرافيا الاجتماعية ، وانتقال الحيوانات (Al-Mussawi, 2016) أو قد يرجع ذلك إلى عوامل مختلفة مثل: الظروف البيئية والتغذية والاجتماعية والاقتصادية

والجغرافية والسلوك الديموغرافي والصحي وعدد عينات المرضى في دراسة الفحص وطريقة التشخيص المستخدمة (Zou et al., 2017).

### 2.2.5: الدراسة المناعية الكروماتوجرافية

أن الدراسة المناعية جاءت لدعم وتأكيد تشخيص الطفيلي بطريقة الفحص المجهرى في جميع الاختبارات المدروسة سواء على المستوى الجنس أو العمر أو أشهر الدراسة أو مصدر مياه الشرب أو مكان السكن حيث بينت الدراسة أن نسبة الإصابة بطريقة الفحص المناعي كانت 6.8 % وقي نسبة أقل من الفحص المجهرى.

### 3.2.5: الدراسة الجزيئية

تعد الطريقة الجزيئية للكشف عن طفيلي الأبواغ الخبيثة باستعمال سلسلة تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR أدق مقارنة مع الطرائق المختبرية الأخرى المجهرية والمناعية وذلك لأنها تستطيع التمييز بين أنواع هذا الجنس واكتشاف الجينات المختلفة باستخدام بادئات مخصصة لكل جين مراد البحث عنه أما الطرائق الأخرى للتشخيص فهي لا تستطيع التمييز بين الأنواع التابعة لهذا الجنس (Guy et al., 2003) جاءت هذه الدراسة غير متطابقة مع دراسات أخرى منها (Minarovicova et al. (2007) ; Ahmed et al. (2016) فضلاً عن أن هناك نسب مختلفة من الإصابة بالطفيلي تم تشخيصها بطريقة PCR منها جاءت دراسة الشباني (2014) بنسبة 72.64% في محافظة الديوانية ، ودراسة (El-Settawy & Fathy (2012 بنسبة 24.4% في مصر، وكذلك (Lim et al. (2011 بنسبة 64% في ماليزيا . يعود السبب في الاختلاف في النسب الى عوامل عدة منها طرائق حفظ وخرن العينات وكذلك عدد العينات والطريقة المتبعة لاستخلاص الحمض النووي DNA وكذلك دقة التشخيص المجهرى ومدى التمييز بين أكياس بيض الطفيلي وأكياس بيض الطفيليات الأخرى .

### 4.5: دراسة الحساسية والنوعية بين الفحوصات المختبرية للكشف عن طفيلي الابواغ الخبيثة.

تشير الحساسية إلى مدى جودة الاختبار في تحديد الأشخاص المصابين بالمرض بشكل صحيح ، أما الخصوصية تهتم بمدى جودة الاختبار في تحديد الأشخاص الذين يتمتعون بصحة جيدة (Johnson et al., 1995) . أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن الحساسية والنوعية لطريقة الصبغة الحامضية المعدلة تختلف عن الحساسية والنوعية للفحص المناعي الكروماتوجرافي وكلاهما يختلفان عن الحساسية والنوعية للفحص الجزيئي. إذ أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن حساسية

الفحص المجهري أقل من حساسية الفحص المناعي والجزئي ولكن الفحص المجهري يكون أكثر خصوصية من الفحصين الآخرين إذ كانت عدد الإصابات في الفحص المجهري 26 عينة مصابة في حين كانت العينات المصابة بالفحص المناعي 22 عينة مصابة وفي الفحص الجزئي 18 عينة مصابة وهذا يدل على ان الفحص المجهري أكثر نوعية من الفحصين إذ بلغت نسبة الإصابة بالفحص المجهري 8.1% والفحص المناعي 6.8% والفحص الجزئي 5.6% وهذا يدل على ان الفحص الجزئي أكثر نوعية من الفحصين المناعي والمجهري في حين وجدت الدراسة هناك عينات موجبة تم تشخيصها بالفحص المجهري أثبتت فيما بعد على أنها عينات سالبة وكذلك وجود عينات شخصت على انها عينات سالبة في الفحص المجهري اثبتت أنها عينات موجبة بالفحص المناعي والجزئي مما يدل على أن الفحص المجهري أقل حساسية من الفحص المناعي والفحص الجزئي وكذلك وجدت الدراسة ان الفحص المناعي أقل حساسية من الفحص الجزئي وكما موضح بالجدول 4-8 ، 4-9 ، 4-10 . توافقت هذه الدراسة مع دراسات بعض الباحثين ومنهم (Weitzel et al. (2006) الذين أكدوا على عدم دقة طريقة الفحص المناعي الكروماتوكرافي وارتفاع نسبة الكشف عن العامل الممرض بطرق تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR. وجدت دراسات أخرى (Ahmet et al. (2018 في تركيا أن طريقة المستضد لديها حساسية 90% وخصوصية 98.2% ، وطريقة الصبغة الحامضية المعدلة لها حساسية 85.7% وخصوصية 100% ، وطريقة PCR لها حساسية 98% وخصوصية 90%.

الاختبارات المصلية هي طرائق تشخيصية مناسبة لمجموعات سريرية عديدة (مثل قطع الحيوانات) لتحديد وجود العامل الممرض بسبب سرعتها وحساسيتها الكافية وقلة تكاليفها. ومع ذلك، يجب على المرء أن يضع في اعتباره أن الاختبارات المناعية غير قادرة على اكتشاف جميع المستضدات لكل الأنواع ( Danišová et al.2016 ). تعد الطرائق الجزئية بما في ذلك تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) طرائق مرجعية ليس فقط للكشف عن الإصابة بداء الأبواغ الخبيثة ولكن أيضاً لتحديد نوع الطفيلي . والتنميط الجيني. علاوة على ذلك ، فإن تحديد الأنواع بالطرائق الجزئية هو بالضبط الذي يؤكد التباين بين الأنواع (Blake et al.2015).

الاستنتاجات والتوصيات

**Conclusions &  
Recommendations**



## الاستنتاجات والتوصيات Conclusions & Recommendations

### الاستنتاجات Conclusions :

عن طريق نتائج الدراسة الحالية تم استنتاج ما يأتي :

- 1- تعد تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخلة هي من أفضل الطرائق المستخدمة في تشخيص الطفيلي.
- 2- يعد طفيلي الأبواغ الخبيثة من أهم أنواع الطفيليات المسببة للإسهال في محافظة كربلاء المقدسة بالرغم من انخفاض نسبة الإصابة بها.
- 2- وجود الطفيليات المرافقة لها تأثير كبير على نسب الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة.
- 3- تؤثر بعض العوامل الوبائية مثل الجنس والعمر والسكن ومصدر مياه الشرب على نسبة تواجد الطفيلي.
- 4- يصيب طفيلي الأبواغ الخبيثة كلا الجنسين وبكافة الأعمار، وتكون الأطفال أكثر عرضة للإصابة بالطفيلي.
- 5- لم توفر تقنية الصبغة الحامضية المعدلة والاختبارات المناعية معدل إصابة دقيق.

## التوصيات Recommendations

- 1- إجراء دراسات مناعية وجزئية واسعة لطفيلي الأبوغ الخبيثة لمعرفة التتابع الجيني لهذا الطفيلي وعدم الاكتفاء بالدراسة التشخيصية.
- 2- إجراء دراسات حول الطفيلي بين الحيوانات كون الطفيلي يصيب الإنسان والحيوان .
- 3- إجراء دراسة حول العلاقة الذي تحدث بين هذا الطفيلي ومسببات الإسهال الأخرى سواء كانت طفيليات أو فيروسات أو بكتيريا.
- 4- التأكد من قيام المؤسسات الصحية بأدراج فحص هذا الطفيلي ضمن الفحوصات الروتينية الخاصة بحالات الاسهال والمتوفرة ضمن المستشفيات والمراكز الصحية.
- 5- -حث المؤسسات الصحية على إقامة دورات تعريفية وتثقيفية حول الطفيليات المسببة للإسهال عند الإنسان لجميع العاملين في المجال الصحي لخطورة هذه الطفيليات على حياة الإنسان.
- 6- استعمال التشخيص الدقيق لمسببات الاسهال وخاصة عند الأطفال لوصف العلاج المناسب لها والقضاء عليها بغية الأقلال من حالات الوفيات عند الأطفال.
- 7- الاهتمام بالنظافة العامة وبتث الوعي الصحي بين سكان المدن والقرى والالتزام بنظافة المنزل والطعام والشراب.

المصادر

**References**

## المصادر العربية Arabic References

- البياتي، مصطفى هادي جواد (2013). التغيرات الفسيولوجية لدى الأطفال المصابين ببعض الطفيليات المعوية في محافظة الديوانية. رسالة ماجستير / كلية العلوم جامعة القادسية. 106 ص.
- الشباني، ريام حميد كامل (2014). دراسة تشخيصية ووبائية الطفيلي خبيء الأبواغ وتأثيره في مكونات الدم لدى الأطفال الوافدين للمستشفيات في محافظة القادسية. رسالة ماجستير / كلية العلوم، جامعة القادسية. 102 ص.
- العتار، ماجد احمد والخطيب، بلسم حسين (1999). الإصابة بمرض الأبواغ الخبيئة في الدواجن مجلة دواجن الشرق الأوسط وشمال افريقيا العدد 146. 31-34 ص.
- الكعبي، صفاء رسن (2006). دراسة وبائية لطفيلي الأبواغ الخبيئة ومسببات الاسهال في محافظة الديوانية رسالة ماجستير/ كلية التربية جامعة القادسية. 104 ص.
- الكلابي، خالدة كاظم عباس (1999) . دراسة وبائية وتحليلية للممرضات المعوية الشائعة والمرتبطة بالأسهال الحاد لدى الأطفال في محافظة النجف ، رسالة ماجستير / كلية التربية للبنات ، جامعة الكوفة . 126 ص.
- بدير، حسن محمد (2007). أفعال بسيطة تصيب بتسم طفيلي الأبواغ الخبيئة وقد تحمي منه جامعة البترا الخاصة، الأردن / كلية الصيدلة والعلوم الطبية، 4 ص. (عن موقع في الأنترنت).
- حسين، زينب علي (2011). نسبة الإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيئة عند الأطفال في مستشفى الزهراء للولادة والأطفال - النجف الأشرف. كلية التمريض / جامعة الكوفة. 8 ص. (عن موقع في الأنترنت).
- عبادة، سري رزاق خضير (2015). تأثير مستخلص الثوم والرمان على الجرذان المصابة تجريبيا بطفيلي الأبواغ الخبيئة ومقارنتها مع عقار Metraniclazole رسالة ماجستير/ كلية العلوم، جامعة القادسية.
- مخلف ، مهند محمد (2008) . دراسة تأثير انتشار طفيلي *Cryptosporidium parvum* في الأطفال دون سن الخامسة من العمر في مدينة الرمادي وضواحيها . كلية التربية / جامعة الانبار . مجلة الأنبار للعلوم الصرفة . العدد الثاني ، المجلد الثاني . 5 ص.
- معلّة، صبا فاضل علي (2008). دراسة وبائية لطفلي الأبواغ الخبيئة في مدينة الحلة، رسالة ماجستير/ كلية التربية للبنات، جامعة الكوفة. 88 ص.

## Forien References المصادر الاجنبية

- Abdel-Messih, I. A., Wierzba, T. F., Abu-Elyazeed, R., Ibrahim, A. F., Ahmed, S. F., Kamal, K., & Frenck, R. (2007).** Diarrhea associated with *Cryptosporidium parvum* among young children of the Nile River Delta in Egypt. *Journal of Tropical Pediatrics*, 51(3), 154-159.
- Abdul-Sada K. M. (2015).** Molecular and Epidemiological Study of *Cryptosporidium spp.* in Mid-Euphrates Area *Cryptosporidium spp.* *Kufa Journal for Nursing Sciences*, Vol.5, No. 1.
- Abu- Alrub, S.M. (2008).** Prevalence of *Cryptosporidium spp.* in children with diarrhoea in the West Bank, Palestine. *The Journal of Infection in Developing Countries*. Vol 2: No 01.
- Acroix, S., R. Mancassola, M. Naciri, and F. Laurent. (2001).** *Cryptosporidium parvum*-specific mucosal immune response in C57BL/6 neonatal and gamma interferon-deficient mice: role of tumor necrosis factor alpha in protection. *Infection. Immun.* 69:1635- 1642.
- Adam, A. A.; Mohamed, E. O. & Abdullah, M. A. (2007).** Cryptosporidiosis Among Patient With Diarrhea Attending Nyala Hospital. *JMS*. 2(1):41-44.
- Ahmed, H.S.; Abd, A.H. & Mohammed, N.Q.(2016).** Detection of *Cryptosporidium parvum* from Feces Samples of Human and Camels by Using Direct Polymerase Chain Reaction Assay Technique. *Al-Qadisiyah.J.Med.Sci.*,15(2):59-62.
- Ahmet, Y., Akkas, O., Guven, E., Ayden, H.and Uslu, H. (2018)** Investigation of *Cryptosporidium spp.* in Immunosuppressive and Immunocompetent Cases with Diarrhea by Microscopic, Serological and Molecular Methods *Middle Black Sea Journal of Health Science*,V: 11–19.

- Akyon, Y., Ergüven, S., Arikan, S., Yurdakök, K., & Günalp, A. (1999).** *Cryptosporidium parvum* prevalence in a group of Turkish children. The Turkish journal of pediatrics, 41(2), 189-196.
- Al-Baldawy,A.N.M.(2017).**Microscopic and Molecular Detection of *Cryptosporidium* Species in Children With Persistent Diarrhea in Al-Najaf Province.M.Sc.thesis, College of Medicine. University of Kufa.93.
- Al-Ezzy, A. I. A., Khadim, A. T., & Hassun, R. H. (2017).** A comprehensive Evaluation of Transmission Methods for *Cryptosporidium* species with special emphasis to *Cryptosporidium Parvum*. Research journal of pharmaceutical biological and chemical sciences, 8(5), 555-570.
- Al-Habsi, K., Yang, R., Williams, A., Miller, D., Ryan, U. & Jacobson, C. (2017).** Zoonotic *Cryptosporidium* and *Giardia* shedding by captured Rangeland goats. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 7, 32-35.
- Al-Hindi ,A. I.; Elmanama, A .A & Elnabris, K. J. A.(2007).** Cryptosporidiosis Among Children Attending Al-Nasser Pediatric Hospital,Gaza,Palestine.Turk Journal of Medical. Science.,37(6):367-3721
- Al-Harthi SA. (2004).** Prevalence of intestinal parasites in school children in Makkah, Saudi Arabia. New Egypt Journal of Medical. 31:37-43.
- Ali, M. A.; Ali, K.; Hossein, K. V. & Abdulsadah, A. R.(2014).** Diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* in Kut, Iraq using different methods. Sch. Journal. App. Medical. Science. 2(3D):1134-1138 ISSN 2347-954X.An International Publisher for Academic and Scientific Resources.
- Al-Kaisy, K.H. and Sultana's,A. (2008)** The effect parameters on the *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* among Al-Khalis and Baladroz district.Diala.J., (27):92-99(In Arabic)

- Al-kubaisy, w. L., Hassanain, A. L. & Alyaa, A. K. (2014).** Intestinal parasitic diarrhea among children in Baghdad–Iraq. *Tropical biomedicine*, 31(3), 499-506.
- Al–Mamouri, A. K. (2000).** Epidemiology of intestinal parasites and head lice in pupils of some primary schools at Al- Mahaweel district, Babylon province (Doctoral dissertation, MSc. Thesis, Science. Collage., BabylonUniv.: 122pp.
- Al-Mosa, A. H. A. (2002).** Epidemiological study of the parasitic causes of some intestinal disorder of human in Al-Hilla city. MS. c. Thesis Collage of Medicine, Kufa University :92pp.
- Al-Mussawi, H.S.M. (2016).** Epidemiological study for *Giardia lamblia* parasites in Babylon province and test activity of cold aqueous extract and crude powder of pomegranate peels in experimental infected cats. M.Sc. Thesis, Science College for women, Babylon University, Iraq, pp. 125.
- ALRikabi,F.S.K.(2012).**Acomparative Study of Cryptosporidiosis Between Calves and Children by Using Two Different Methods of Diagnosis in Thi-Qar province. M. Science. thesis. College of Veterinary Medicine.University of Al-Qadissiaya. 124. 4(3):11-19.
- Al-Taie, M.H. (1997).** Epidemiological study of cryptosporidiosis in Diyala province, M. Science. Thesis, College of Veterinary. Medical. Baghdad University, 117 p.
- Al-Taie, H.H.I. and Al-Mosa, A.H. (2006).** prevalence rate of intestinal parasite associated with diarrhoea. *Alotaqani.J.*,5:108-115.
- Al-Tufaili, R. A. N., Khayoon, S. Q., & Rashid, A. A. (2014).** Investigation of parasitic contamination in Kufa river water-Al-Najaf province. *Al-Kufa University Journal for Biology*, 6(2), 11.  
<http://journals.uokufa.edu.iq/index.php/ajb/article/download/8472/pdf>

- Al-Warid, H., Mahmood, S. & Al-Saqur, I. (2010).** Study in Epidemiology and PCR Detection of Cryptosporidiosis in North of Baghdad. Ph. D. Thesis. College of Science, University of Baghdad, Iraq. 69pp.
- Al-Warid, H.S.J.(2010).** Study in Epidemiology and PCR Detection of Cryptosporidiosis in North of Baghdad. Ph.D thesis, College of Science, University of Baghdad. 166.
- Al-Yassaree, H.F.A. (2004).** Identification and diagnosis of three intestinal protozoa (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*) in Babylon province, Iraq. Medical. Science. Thesis, Science College, Kufa University Iraq, pp. 80.
- Alyousefi N.A.(2012).** Molecular Epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* among Outpatients in Sana'a City, Yemen. PH.D Thesis. Faculty Of Medicine, University Of Malaya, and Kuala Lumpur.
- Al-Alousi, T. I., Al-Ani, A. J., and Al-Rawi, S. A. (2003).** Cryptosporidiosis in children and calves in Mosul, Iraq. Medical. Journal. Tikrit University, 119.
- Anderson, B. C." (1981)** Patterens of shedding of Cryptosporidial oocyst in Idah calves". Journal.Am.Vet.Medical.Assoc.,Vol .178, No.9, pp.982-984,.
- Anderson, B.C. and Bulgin , M.S. (1981)** Enteritis caused by *Cryptosporidium* in calves . Veterinary .Medical .Small Anim,76(6):865-868.
- Ansari, S., Bahadur, S., Parajuli, K., and Paudyal, R. P. A. (2012).** Pattern of acute parasitic diarrhoea in children under five years of age in Kathmandu, Nepal. Open Journal of Medical Microbiology, 2(03), 95.
- Areeshi, M.Y.; Beeching, N. J.; Anthony, C. (2007).** Cryptosporidiosis in Saudia Arabia and Neighboring Countries. Hart Ann Saudi Med., 27(5):325-32.



- 
- Argenzio, R.A., Leece, J. & Powell, D.W.( 1993).**Prostanoids Inhibit Intestinal NaCl Absorption in Experimental Porcine Cryptosporidiosis. *Gastroenterol.*, 104:440-447.
- Arora, D.R.. (2009).**AIDS –Associated Parasitic Diarrhoea. *Indian Journal. Medical. Microbiol.*, 27(3):185-190.
- Aryal ,S.(2015).**Polymerase Chain Reaction (PCR)- Principle, Procedure, Types, Applications and Animation . 4.32/5 (151)
- Ballani, N.; Shujatullah, F.; Khan, H. M. ;Malik, A.; Ali, M. S. M.& Khan,P.A. (2012).**Intestinal Protozoa in Immunosuppreession: Medical Hassle.*J.Bacteriol.Parasitol.*,3(3):1-5.
- Baqai, R. S.; Anwar,S. U.; Kazmi.(2005).**Detection of *Cryptosporidium* in Immune Suppressed Patients. *Pakist Journal.Ayup. Medical .Collage . Abbottabad.*, 17(3):1-3.
- Beaver, P. C., Jung, R. C. (1985).** Animal agents and vectors of human disease.5th Lea and Febiger, p249.
- Blake, D. P., Clark, E. L., Macdonald, S. E., Thenmozhi, V., Kundu, K., Garg, R., ... and Reid, A. J. (2015).** Population, genetic, and antigenic diversity of the apicomplexan *Eimeria tenella* and their relevance to vaccine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(38), E5343-E5350.
- Bonnin ,A.; Lopez ,J. and Dubremetz ,J.F.(1999)** Immuno detetion of the microvillus cytoskeleton molecules villin and ezrin in the parasitophorous vacuole wall of *Cryptosporidium parvum* *European.J,Cell .Bioll .*, 78-801 .
- Borad, A., and Ward, H. (2010).** Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future microbiology*, 5(3), 507-519.

- Borowski, H.; Clode, P.L. and Thompson .R.C.A.(2008).** Active invasion andencapsulationA reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. Trends Parasitol. 24 (11): 509-516
- Bouzid M.;Paul R. H.; Rachel, M.C.andKevin, M. T.(2013)** .*Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. Biomedical Research Centre, Norwich School of Medicine, University of East Anglia, United Kingdoma. Vol. 26, No. 1, Clinical Microbiology Reviews p. 115–134.
- Brook, E.J., Hart, C.A., French, N.P. and Christley, R.P. (2009)** Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. Veterinary J 179, 378–382.
- Bruce B. B.; Mitchell A. B.; Henry M. B.; Jeffrey, L. L.; Carlos, D. and C. Robert Horsburgh. (2000).** Risk of *Cryptosporidium parvum*Transmission between Hospital Roommates. 948 / Clinical Infectious Diseases; 31:947–50. The Infectious Diseases Society of America.
- Bull, S.; Chalmers, R. and Sturtee, A. (1998).** Cross-reaction Of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with Sporocysts of monocystis species .Vet .parasitol .77:165 -110 .
- Bushen O.Y, Lima A.A.,and Guerrant,R.L. (2006).** Cryptosporidiosis. In RL Guerrant, DH Walter, PF Weller(eds), Tropical Infectious Diseases: principles, pathogens, & practice, 2nd ed., Elsevier/Churchill Livingstone, Philadelphia, USA, p. 1003-1014.
- Cabada, M. M., White, A. C., Venugopalan, P., & Sureshbabu, J. (2015).** Bronze MS, ed." Cryptosporidiosis Treatment & Management". Medscape. WebMD. Retrieved January 2017

- Cacciò, S., Pinter, E., Fantini, R., Mezzaroma, I., & Pozio, E. (2002).** Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. *Emerging Infectious Diseases*, 8(1), 85.
- Cacciò, S. M. and Widmer, G. (ed.) (2014).** *Cryptosporidium* Parasite and Disease. *Biomedical Sciences Medical Microbiology*. Springer- Verlag, Wien
- Cacciò, S.M. & Putignani, L. (2014).** Epidemiology of human cryptosporidiosis in *Cryptosporidium* Parasite and Disease. (Vienna: Springer) 43– 79
- Casemore , D . P.; Sands ,R .L. and Curry ,A. (1985).** *Cryptosporidium* Species a new human pathogen , *Journal of Clinical Pathology*.38: 1321-1336.
- Casemore , D.P. (1999)** Laboratory methods for diagnosis *Cryptosporidium* . *Journal.Clinical.Pathology*.44:445-450
- Casemore, D.P., (1990).** Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 44: 445-451.
- Casman, E., Fischhoff, B., Small, M., Dowlatabadi, H., Rose, J., and Morgan, M. G. (2001).** Climate change and cryptosporidiosis: a qualitative analysis. *Climatic Change*, 50(1-2), 219-249.
- Crawford, F.G. and Vermund , SH. (1988).** Human Cryptosporidiosis .*Crit .Rev .Microbial .* 16:113-159.
- Center for Disease Control and Prevention, Parasites- *Cryptosporidium*** (also known as “Crypto”), April 20, (2015), Retrieved November 30.
- Cerrallos , A. M. Zhang , X. Waldor , M. K. Jaison ,S. Zhou , X. Tzipori , S.Neutra , M. R. and Ward , H. D. (2000)** Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15 . *Infection. Immun.* 68 : 4108 -4116.

- Certad, G.; Nguanesavanh, T.; Guyot, K.; Gantois, N.; Chassat, T.; Mouray, A. et al (2007).** *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma Infection Agent Cancer, 2, 22.
- Chalmers, R. M. and Davies, A. P. (2010).** Minireview: Clinical Cryptosporidiosis. *Exp. Parasitology.*, 124:138-146.
- Chalmers, R.M. and Pollock, K.G.J. (2008)** *Cryptosporidium* in Scotland 2007: reference laboratory data. *HPS Wkly Rep* 42, 385–387.
- Chalmers, R.M.; Elwin, K.; Hadfield, S.J. and Robinson, G. (2011).** Sporadic human Cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium cuniculus*. United Kingdom. *Emerg Infection* 17:536-8.
- Chappell, C. L., Okhuysen, P. C., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D. E., Tanriverdi, S. and Tzipori, S. (2006).** *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75, 851–857.
- Charron, D. F., Thomas, M. K., Waltner-Toews, D., Aramini, J. J., Edge, T., Kent, R. A., ... and Wilson, J. (2004).** Vulnerability of waterborne diseases to climate change in Canada: a review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 67(20-22), 1667-1677
- Checkley, W.; Epstein, L. D.; Gilman, R. H.; Black, R. E.; Cabrera, L. & Sterling, C. R. (1998).** Effects of *Cryptosporidium parvum* infection in Peruvian children: growth faltering and subsequent catch-up growth. *American Journal of Epidemiology*, 148, 497.
- Checkley, W., White Jr, A. C., Jaganath, D., Arrowood, M. J., Chalmers, R. M., Chen, X. M., ... and Huston, C. D. (2015).** A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(1), 85-94.

- Chermette , R. & Boufassa , Q. S. (1988)** Cryptosporidiosis a Cosmopolitan disease in Animals and Man , 2nd ed . Office International Dis. Epizooties ,France.pp:123-128.
- Chin , J . (Ed.) . (2000) .** Control of communicable diseases:Manual , 17 th edn ., Amer . public Health Assoc ., Washington: 624pp.
- Clark, D. P. (1999).** New insights into human cryptosporidiosis. Clinical Microbiology Review. American Society for Microbiology. Vol.12,No.4. p. 554–563.
- Clark, D. P. (1999).** New insights into human cryptosporidiosis. Clinical Microbiology Reviews, 12(4), 554-563.
- Cole, D. J., Snowden, K., Cohen, N. D., & Smith, R. (1999).** Detection of *Cryptosporidium parvum* in horses: thresholds of acid-fast stain, immunofluorescence assay, and flow cytometry. Journal of clinical microbiology, 37(2), 457-460.
- Conn, D. B., Weaver, J., Tamang, L. & Graczyk, T. K. (2007).** Synanthropic flies as vectors of *Cryptosporidium* and *Giardia* among livestock and wildlife in a multispecies agricultural complex. Vector- Borne and Zoonotic Diseases, 7, 643-652.
- Coombs, G. H. ; Denton , H. ; Brown , S. M. A. and Thong , K. W. (1997)** Biochemistry of coccidiosis. Adv. Parasitol. 39 : 141 – 226.
- Costa, D., Razakandrainibe, R., Valot, S., Vannier, M., Sautour, M., Basmaciyan, L., Gargala, G., Viller, V., Lemeteil, D., Ballet, J. J., Dalle, F., & Favennec, L. (2020).** Epidemiology of cryptosporidiosis in france from 2017to2019.Microorganisms,8(9),1–17.
- Coupe, S., Sarfati, C., Hamane, S., & Derouin, F. (2005).** Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and

- restriction fragment length polymorphism. Journal of Clinical Microbiology, 43(3), 1017-1023.
- Current , W.L. & Snyder , D.B. (1988).** Development and Serologic evaluation of acquired immunity to *Cryptosporidium baileyi* by broiler chickens .Poult .Sci .67:720-729.
- Current, W. L., & Garcia, L. S. (1991).** Cryptosporidiosis. Clinical microbiology reviews, 4(3), 325-358.
- Curriero, F. C., Patz, J. A., Rose, J. B., and Lele, S. (2001).** The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948–1994. American journal of public health, 91(8), 1194-1199.
- Daniřsová O, Valenčáková A, Petrincová A. (2016)** Detection and identification of 6 *Cryptosporidium* species in livestock in Slovakia by amplification of SSU and gp60 genes with use of PCR analysis. Ann Agric Environ Med23(2):254–258.
- Das,P.;Roy,S.S.;Mitradhar,K.;Dutta,P.;Bhattacharya,M.K.;Sen,A.;Ganguly,S .; Bhattacharya, S. K.; Lai , A. A & Xiao, L.(2006).**Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp.From Children in Kolkata, India. Journal. Clinical. Microbiology.,44(11):4246-4249.
- Davidson, P. Cs. (2010).** Characterization Of Pathogen Transport In Overland Flow Ph.D. Theses, Agricultural and Biological Engineering in the Graduate College. Univ. Of Illinois at Urbana-Champaign,.Urbana, Illinois.
- Dawson, D. (2005).**Foodborne Protozoan Parasite. Int. Journal. Food Microbiology. ,103: 207-227.
- Deng, M., Lancto, C. A., & Abrahamsen, M. S. (2004).** *Cryptosporidium parvum* regulation of human epithelial cell gene expression. International journal for parasitology, 34(1), 73-82.

- Desai, N.T.; Sarkar,R.; Kang ,G. (2012).**Cryptosporidiosis: an under-recognized public health problem. Trop Parasitol 2(2):91–98. doi:10.4103/2229-5070.105173.
- Defra., E. (2008)** Annual Zoonoses Report, 2008. London, UK: Defra.
- Downey, A. S. & Graczyk, T. K. (2007).** Maximizing recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from spiked eastern oyster (*Crassostrea virginica*) tissue samples. Applied and environmental microbiology, 73, 6910-6915.
- Dubey , J .P . (1993)** Intestinal protozoa infection., Vet .Clin. North Am.Small Animal.Pract.,23(1):37-55.
- Dumain, J. E., Tandel, J., & Striepen, B. (2020).** *Cryptosporidium parvum*. Trends in Parasitology, 36(5), 485–486.
- Duggal,M.(2013).**Detection and Quantification of *Cryptosporidium* Oocysts in Environmental Water Samples .M.Sc.thesis.University of Guelph,Ontario,Canada. 119.
- Dyab, A., Amin, M. M., Dyab, A. K., El-Salahy, M., Monib, M., Hawary, B., & Desoky, R. M. (2018).** Cryptosporidiosis in Immunocompromised Children. Egyptian Journal of Medical Microbiology, 27(2), 143–149.
- Elgun, G. and Koltas, I. S.(2011).** Investigation of *Cryptosporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. Parasitology Research 108: 395–397
- El-Missiry, Adel, Laila Abd El-Hameed, Ghada Saad, Ayman El-Badry, Yosra Helmy, & Mai Shehata. (2019).** “Molecular Genetic Characterization of Human *Cryptosporidium* Isolates and Their Respective Demographic, Environmental and Clinical Manifestations in Egyptian Diarrheic Patients.” Parasitologists United Journal 12(3):187–96.

- El-Settawy, M.A. & Fathy, G.M. (2012).** Evaluation and Comparison of PCR, Coproantigen ELISA and Microscopy for Diagnosis of *Cryptosporidium* in Human Diarrhoeic Specimens. *Journal. Am. Sci.*, 8(12):1378-1385. *Reaction. Journal of food and nutrition research.*, 46(2): 58-62.
- Fallah, E.; Nahavandi, K.H.; Jamali, R.; Poor, B.M. & Asgharzadeh, M. (2008).** Molecular Identification of *Giardia duodenalis* Isolates from Human and Animal Reservoirs by PCR-RELP. *Journal of Biology Science.*, 14:1-6.
- Fall, A.; Thompson, R.C.; Hobbs, R.P.; Morgan-Ryan, U. (2003).** Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium* *Journal Parasitology.* 89:399-402.
- Farthing, M. J. G. (2006).** Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. *Nature Clini. Practice Gastroentero. & Hepato.* 3(8):436-445.
- Faust, E.C. ; Russ, P.F. & Jung, R. C. (1970).** Craig and Fausts clinical Parasitology, 8<sup>th</sup> end., Lea & Febiger, Philadelphia : 890 pp.
- Fayer, R. (2004).** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary parasitology*, 126(1-2), 37-56.
- Fayer, R. (2009).** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol.* Jan 124(1):90-7. doi: 10.1016.
- Fayer, R. (2010).** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental parasitology*, 124(1), 90-97.
- Fayer, R. and Xiao, L. (2007).** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2<sup>nd</sup>.ed., CRC press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York



- Fayer, R., Dubey, J. P., & Lindsay, D. S. (2007).** Zoonotic protozoa: From land to sea. *Trends in parasitology*, 20(11), 531-536
- Fayer, R., Santín, M., & Dargatz, D. (2010).** Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow–calf operations in the United States. *Veterinary Parasitology*, 170(3-4), 187-192.
- Fayer, R.; Morgan, U. & Upton,S.(2000).** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. Journal. Parasitology*.30:1305
- Ferrari C. HBV and the immune response. Liver Int. 2015;35:121–128.**
- Finish, TM. &Tawfeek, ZM.(2013).** Diagnosis of *Cryptosporidium parvum* oocysts from it's natural sources, *Journal of Al-Anbar Veterinary Sciences*, 6: 44-48.
- Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2018).** Parasitic protozoa of farm animals and pets. *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*, April, 1–438. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5>
- Florescu, D. F. & Sandkovsky, U. 2016.** *Cryptosporidium* infection in solid organ transplantation. *World journal of transplantation*, 6, 460.
- Gabriel, T. A.W. (2010).** Determination, Enumeration and Viability Test of *Giardia* Cyst and *Cryptosporidium* Oocyst from Municipal Drinking Water in Addis Ababa. MSc. Thesis University of Addis Ababa.
- Gatei, W.; Wamae, C.N.; Mbae, C.; Waruru, A.; Mulinge, E.; Waithera, T.; Gatika, S.M.; Kamwati, S.K.;Revathi, G. & Hart, C.A.(2006).** *Cryptosporidiosis: Prevalence, Genotype Analysis, and Symptoms Associated With Infections in Children in Kenya.* *Am. J. Trop. Med. Hyg.*,75: 78–82.

- Ghenghesh, K. S.; Khaled, G.; Hanan, ELM. & Ezzddin, F. (2012).** *Cryptosporidium* in countries of the Arab world: the past decade (2002–2011). *Libyan J Med*; 10.3402 /ljm 7:.v7i0.19852.
- Girones, R.; Maria, A. F.; Jose, L. A.; Jesus, . ; Byron, C. ; Adriana, D. C.etal. (2010).** Molecular detection of pathogens in water-The pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* 44(15): 4325-4339
- Gobet, P., & Toze, S. (2001).** Sensitive genotyping of *Cryptosporidium parvum* by PCR-RFLP analysis of the 70-kilodalton heat shock protein ( HSP70 ) gene, 200, 37–41. Anderson, B. C." Patterens of shedding of *Cryptosporidial* oocyst in Idah calves".*J.Am.Vet.Med.Assoc.*,Vol .178, No.9, pp.982-984,1981.
- Goldman, L. and Schafer, Al. (2015).** In *Interstitial lung disease*, eds. *Goldmanscecil medicine*.25<sup>th</sup>ed. Philadelphia, PA: Elsevier saunders; Chap 92.
- Goodwin , M.N.(1989).** *Cryptosporidiosis* in brid-a review. *Avain pathol .*,18:365-84
- Gosif , B. (2004).** HEPP Report(HIV and Hepatitis Election person project), infection disease in correction by Medical School office of continuing Medical Education Hepp report Brown .edu.USA.12p.
- Graczyk, T. K., Knight, R. & Tamang, L. (2005).** Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. *Clinical microbiology reviews*, 18, 128-132.
- Guerrant, R. L. (1997).** *Cryptosporidiosis*: an emerging, highly infectious threat. *Emergin Infection diseases*. 3(1):51-55.
- Guy,R.A.;Payment ,P.;Kurll,U.J.&Horgen,P.A.(2003).**Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water

- Samples and Sewage. *Appl. Environmental. Microbiology.*,69(9):5178-5185.
- Guy, RA.; Xiao,C.andHorgen, PA. (2004).** PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. *Journal. Clinical. Microbiology.*; 42(7):3317-20.
- Gunasekera, S., Zahedi, A., O’dea, M., King, B., Monis, P., Thierry, B., Carr, J. M., & Ryan, U. (2020).** Organoids and bioengineered intestinal models: Potential solutions to the *Cryptosporidium* culturing dilemma.
- Hooda, P.S.; Moynagh, M.; Svoboda, I.and Miller A. (2000) .** Macroinvertebrate as bioindicators of water pollution in streams draining dairy farm catchments. *Chemistry and Ecology*17, 17–30.
- Hogg, R. V. and Craig, A. T. (1995).** *Introduction to Mathematical Statistics*.5th. ed., Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ, USA.
- Huang, D.B.;Chappell, C.; Okhuysen, P.C. (2004).** Cryptosporidiosis in children. *Semin. Pediatr. Infection diseases.*, 15(4): 253-9. Human disease 5th ed . Lea and febiger p249
- Hunter, P. R. & Nichols, G. 2002.** Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews*, 15, 145-154.
- Hunter, P. R., and Thompson, R. A. (2005).** The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International journal for parasitology*, 35(11-12), 1181-1190.
- Hunter, P. R., Hughes, S., Woodhouse, S., Syed, Q., Verlander, N. Q., Chalmers, R. M., ... and Osborn, K. (2004).** Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. *Emerging infectious diseases*, 10(7), 1241.

- Hussein, A. (2011).** Prevalence of intestinal parasites among school children in northern districts of West Bank- Palestine Tropical Medicine and International Health. Volume 16. No 2. pp 240–244.
- Hussein, Z. A.(2012)** .The incidence of *Cryptosporidium parvum* in children in Al -Zahra Hospital –Najaf, College of Nursing University of Kufa .
- Ibrahim, A., Al, A., Khadim, A. T., & Hassun, R. H. (2017).** Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences A comprehensive Evaluation of Transmission Methods for *Cryptosporidium* species with special emphasis to *Cryptosporidium Parvum* September – October September – October. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 8(0975–8585), 555–570.
- Ichhpujani , R . L . & Bhtia, R .( 1994) .** Medical parasitology. Jaypee Bros Med . Publ ., New Del hi : 384 pp .
- Iqbal, J. ; Hira, P. R.; Al-Ali, F.& Philip, R .(2001).**Cryptosporidiosis in Kuwait Children :Seasonality and Endemicity Clinical Microbiology Infection.,7(5):261-266.
- Jaaffer, H. S. (2011).** Prevalence of *Gairdia lamblia* and *Entamoeba histolytic/Entamoeba* dispare infections among Children in AL-Shulaa and AL-khadimya–Baghdad-Iraq. Journal of university of Anbar for Pure science, 5(2), 6-10.
- Jarallah, H. M. (2012).** Intestinal parasitic infections among rural villages in Basrah marshes regions. Journal of Basrah Researches Sciences, 38(2), 40–43.
- Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2010).** Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies—Research review. Biotechnology advances, 28(1), 17-26.

- Johnson, A. E., Gordon, C., Palmer, R. G., & Bacon, P. A. (1995).** The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 38(4), 551-558.
- Jokipii, L. A.M.M.(1986).** Timing of Symptoms and Oocysts Excretion in Human Cryptosporidiosis. *New Engl. Journal Medical.*, 315:1643-1647.
- Jomah, N. R., & Mallah, M. O. (2016).** Comparison Study Of Real-Time PCR And Microscopy For Detection Of *Cryptosporidium parvum* In Diarrheic Children In AL-Muthanna Province– Iraq. 1.
- Julien, D. A., Sargeant, J. M., Guy, R. A., Shapiro, K., Imai, R. K., Bunce, A., ... & Harper, S. L. (2019).** Prevalence and genetic characterization of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in human in Iqaluit, Nunavut, Canada. *Zoonoses and public health*.
- Kadir , M.A.(2004).** Cryptosporidiosis in Man and Animal in Al-Tameem Province / Iraq. *Iraqi Journal. Veterinary.Medical.*, 28(1):235-243.
- Kato, S., Lindergard, G., & Mohammed H.O. (2003)** Utility of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (*COWP*) gene in a nested PCR approach for detection infection in cattle. *Veterinary parasitology*; 111(2-3): 153-159.
- Khan , Blennerhasset , P.A. Varghese, A.K. Chowdhury, S.K. khan, W.A Rogers, K.A. Karim, M.M. (2004).** Cryptosporidiosis among Bangladeshi children with diarrhea: a prospective, matched, casecontrol study of clinical features, epidemiology and systemic antibody responses. *Am. Journal Trop. Medical. Hyg.*, 71(4):412-9.
- Kia , E.B. ; Hosseini , M. ; Meamar , A.R. & Rezaein , M.(2008).** Study of Intestinal Protozoan Parasites in Rural Inhabitants of Mazandaran Province Northern Iran. *Iranian Journal Parasitology.*, 3(1):21-25.

- King, B., Fanok, S., Phillips, R., Swaffer, B. & Monis, P. (2015).** Integrated *Cryptosporidium* assay to determine oocyst density, infectivity, and genotype for risk assessment of source and reuse water. *Applied and environmental microbiology*, 81, 3471-3481.
- Kjos, S.A.; Jenkins, M.; Okhuysen, P.C.; and Chappell C.L. (2005).** Evaluation of recombinant oocyst protein CP41 for detection of *Cryptosporidium* – specific anti bodies. *clinical. Diagn. Lab Immunol.*12, 26-272.
- Korpe, P. S., Haque, R., Gilchrist, C., Valencia, C., Niu, F., Lu, M., ... & Duggal, P. (2016).** Natural history of cryptosporidiosis in a longitudinal study of slum-dwelling Bangladeshi children: association with severe malnutrition. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(5), e0004564.
- Kosek, M., Alcantara, C., Lima, A. A., & Guerrant, R. L. (2001).** Cryptosporidiosis: an update. *The Lancet infectious diseases*, 1(4), 262-269.
- Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S., ... & Faruque, A. S. (2013).** Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet*, 382(9888), 209-222.
- Lean I.S.; McDonald, V. & Pollok R.C. (2002).** The role of cytokines in the pathogenesis of *Cryptosporidium* infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*.15, 229-234.
- Leav, B.A; Mackay, M. and Ward H.D. (2003).** *Cryptosporidium* Species: New Insights and Old Challenges. *Clinical Infection. Diseases*. 36:903-908.
- Leoni, F., Amar, C., Nichols, G., Pedraza-Diaz, S., & McLauchlin, J. (2006).** Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *Journal of medical microbiology*, 55(6), 703-707.

- Lewis, A., Kitson, A., & Harvey, G. (2016).** Improving oral health for older people in the home care setting: An exploratory implementation study. *Australasian Journal on Ageing*, 35(4), 273–280. <https://doi.org/10.1111/ajag.12326>
- Li, N., Neumann, N. F., Ruecker, N., Alderisio, K. A., Sturbaum, G. D., Villegas, E. N., ... Xiao, L. (2015).** Development and evaluation of three real-time PCR assays for genotyping and source tracking *Cryptosporidium spp.* in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(17), 5845–5854.
- Li-Guang ,T. ; Jia-Xu, C. ; Tian-Ping , W. ; Guo-Jin ,C. ; Peter, S. ; Feng-fFeng, W. ; Yu-Chun , C. ; Xiao-Mei , Y. ; Jian , G .; Li , Z. ;& Xiao-Nong , Z .(2012).**Co - Infection of HIV and Intestinal Parasites in Rural Area of China.*Parasites&Vectors*.1-7.
- Lim,Y.A.L.;Iqbal,A.;Surin,J.;Sim,B.L.H.;Jex,A.R.;Nolan,M.J.;Smith, H.V. & Gasser, R.B .(2011).**First Genetic Classification of *Cryptosporidium* and *Giardia* From HIV/ADIS Patients in Malaysia.*Infect.Genetics and Evalution.*,11:968-974.
- Lindergard, G., Nydam, D. V., Wade, S. E., Schaaf, S. L., & Mohammed, H. O. (2003).** The sensitivity of PCR detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples using two DNA extraction methods. *Molecular Diagnosis*, 7(3), 147-153.
- Liu. H.; Shen, Y.;Yin, J.;Yuan, Z.;Jiang ,Y.; Xu, Y.etal. (2014).** Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal outpatients in China. *BMC Infectious Diseases*. 14:25. doi: 10.1186/1471-2334-

- Lucy, F. E., Graczyk, T. K., Tamang, L., Miraflor, A. & Minchin, D. (2008).** Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. *Parasitology research*, 103, 1369.
- Ma, P. and Soave, R. (1983).** Three- steps stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*, Volume. 147(5): 824-28.
- Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB et al (1994)** A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporid- ium.
- Magi, B., Canocchi, V., Tordini, G., Cellesi, C. & Barberi, A. (2006).** *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. *Parasitology research*, 98(2), 150-152.
- Mahdi, N.K.and Ali, N.H. (2002)** intestinal parasite including *Cryptosporidium spesies*, in Iraqi patients. with sickle-cell anaemia *Estern Mediterranean health journal*, volum.8(2)20-25.
- Mahgoub, E . S . ; Al-Mahbashi , A. & Abdulatif , B .(2004).** Cryptosporidiosis in Children in anorth Jordanian Pediatric Hospital.*Eastern Mediterranean Health.,J.10(4/5):494-501.*
- Mallah M. O. and Jomah N. R. (2015).** Epidemiological and Molecular Study for Distribution of *Cryptosporidium parvum* in Diarrheic Children in Al-Muthanna Province, Iraq. *Donnish Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. Vol 2(1).
- Marshall, M.M., Naumovitz, D. Ortega, Y. & Sterling C.R. (1997).** Waterborne protozoan pathogens.*Microbiol.Rev.,10(1):67-85.*
- Mayo Clinic Staff, Diseases and Conditions: Cryptosporidium infection, January 02, (2014), 20030375?p=1, Retrieved December 1, 2015.**



- Mbanugom J.I., & Agu, V.C. (2006)** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infections in children, Aged 0-15years, in Anambra state, Nigeria. Nig Journal Parasitology., 26: 1-5.
- McCluskey, B. J. Greiner, E. C. and Donovan, G. A. (1995).** Patterns of *Cryptosporidium* oocysts shedding in calves and a comparison of two diagnostic methods . Vet. Parasitology. 60 (3-4) : 185-190 .
- Mead, J. R. (2014).** Prospects for immunotherapy and vaccines against *Cryptosporidium*. Human vaccines & immunotherapeutic, 10(6), 1505-1513.
- Megremis, S.; Segkos, N.; Daskalaki, M.; Tzortzakakis,E.;Paspatis, G.; Zois ois ,E.andSfakianaki, E. (2004).** Gall bladder cryptosporidiosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome.sonographic evaluation of the disease's course. Journal Ultrasound Medical;23:137-40.
- Mehlhorn,H.(2016).**Protozoans Attacking Humans in; Mehlhorn, H.(ed.),Human Parasites:Diagnosis, Treatment, Prevention.7thed., <http://www.springer.com/978-3-319-32801-0> New York. 72-76.
- Michel, M.Y.; Khalifa, A.M. and Ibrahim I.R. (2000).** Detection of the *Cryptosporidium parvum* antigen by Co-agglutination test and ELISA.Eastern Mediterranean Health Journal. 6(5): 898-907
- Melville, S. E. (2004).** Parasite genomics protocols. Human press Inc., Totowa, New Jersey, USA: 452 pp.
- Meredith , S. ; Kroom , N. ; Sondrop , E. (1995).** Astabal Direct Agglutination Test Based on Freez-Direct Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis .J.Clin.Microbial.,33:1742-1745.
- Minarovicova,J.; Kacliková,E, Rascenicsová,K.& Siekel,P.(2007).** Detection of *Cryptosporidium parvum* by Polymerase Chain Reaction. Journal of food and nutrition research.,46(2): 58-62.

- Mohammad, F. I. (2018).** Detecting of virulence factors *COWP* gene and CP15 gene for *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction (PCR). Al-Qadisiyah Journal of Pure Science, 23(2), 39-47.
- Mohanad M.M. (2008).** The study of *Cryptosporidium parvum* dispersal in children less than five years old in Ramadi province. Journal. Al-Anbar Univercity. Science., 2(2)84-88.
- Molloy, SF.; Tanner, CJ.; Kirwan, P. (2011).** Sporadic *Cryptosporidium* infection in Nigerian children: risk factors with species identification. *Epidemiol Infection.* 139(6):946–954
- Molbak K, Andersen M, Aaby P, Hojlyng N, Jakobsen M, Sodemann M et al. 1997.** *Cryptosporidium* infection in infancy as a cause of malnutrition: a community study from Guinea-Bissau, west Africa. *Am journal Clinical Nutr.* ;65(1):149–152.
- Morgan, U. M., Constantine, C. C., O'Donoghue, P., Meloni, B. P., O'Brien, P. A., & Thompson, R. A. (1998).** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis. *The American journal of tropical medicine and hygiene,* 52(6), 559-564.
- Morgan , U. M. Xiao , L. Monis , P. Irwin , P. J. Fayer , R. , Fall , A. Denholm , K. M. Limor , J. Lal , A. A. and Thompson , R. C. A. (2000).** *Cryptosporidium* in domestic dogs : the dog phenotype . *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 2220 – 2223.
- Morgan-Ryan, U. M., Fall, A., Ward, L. A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Payer, R., and Xiao, L. (2002).** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology,* 49(6), 433-440.

- Muraleedharan ,K.(2009).***Cryptosporidium parvum* – an Emerging Protozoan Parasite of Calves in India Associated With Diarrhoea Among Children. *Curr. Sciences*,96(12):1562-1563.
- Nagosso, B. E., Nkwengulila, G., & Namkinga, L. A. (2015).** Identification of pathogenic intestinal parasitic protozoa associated with diarrhea among under-fives children in dar es salaam, Tanzania. *International Invention Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2(4), 49-55.
- Nahrevanian, H., Azarinoosh, S. A., Esfandiari, B., Ziapoor, S. P., Shadifar, M., Amirbozorgy, G., ... & Davoodi, J. (2010).** Current situation of *Cryptosporidium* and other enteroparasites among patients with gastroenteritis from western cities of Mazandaran province, Iran, during 2007-2008. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 3(3).
- Nahrevanian, H.; Assmar, M. and SaminM.G.h. (2007).** Cryptosporidiosis among immunocompetent patients gastroenteritis in Iran: a comparison with other enteropathogenic parasites. *Journal. Microbiol. Immunol. Infection*. 40:154-156
- Naumova, E. N., Jagai, J. S., Matyas, B., DeMaria, A., MacNeill, I. B., and Griffiths, J. K. (2007).** Seasonality in six enterically transmitted diseases and ambient temperature. *Epidemiology & Infection*, 135(2), 281-292.
- Newman, R. D., Wuhib, T., Lima, A. A., Guerrant, R. L., and Sears, C. L. (1993).** Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 49(2), 270-275.
- Nielsen, C. K., & Ward, L. A. (1999).** Enhanced detection of *Cryptosporidium parvum* in the acid-fast stain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(6), 567–569. <https://doi.org/10.1177/104063879901100621>

- Núñez, F. A., González, O. M., González, I., Escobedo, A. A., & Cordoví, R. A. (2003).** Intestinal coccidia in Cuban pediatric patients with diarrhea. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(4), 539-542.
- OIE. (2008).** Cryptosporidiosis .Chapter2 .9 .4 .OIE , terrestrial manual,OIE.:1192 -1215.pp
- Okhuysen PC, Chappell CL, Crabb JH, Sterling CR, DuPont HL (1999)** Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *Journal Infection diseases* 180(4):1275–1281. doi:10. 1086/315033
- Olewi, M.K. (2015)** prevalence study for main protozoa diarrheal among patients by using microscopically and molecular methods in Babylon province, Thesis of master College of Science for Women, Babylon university,23-25pp.
- Othman,N.F.(2000).**Comparison Between Different Laboratory Methods for Diagnosis of *Cryptosporidium* Species.P.D.C.L.I.Tikrit Univ
- Oyibo, W. A., Okangba, C. C., Nwanebu, F. C. & Ojuromi, T. (2011).** Diagnosis of Intestinal Cryptosporidiosis in Africa:Prospects and
- Palit,A.;Sur,D.; Mitradhar ,K. & Saha, M.R.(2005).**Asymptomatic Cryptosporidiosis in Aperiurban Slum Setting in Kolkata,India-aPilot Study.*Jpn. journal.Infection. diseases.*,58(2):110-111.
- Pantenburg, B., Dann, S. M., Wang, H. C., Robinson, P., Castellanos-Gonzalez, A., Lewis, D. E., & White, A. C. (2008).** Intestinal immune response to human *Cryptosporidium* sp. infection. *Infection and immunity*, 76(1), 23-29.
- Parker, J. F. W., & Smith, H. V. (1993).** Destruction of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by sand and chlorine. *Water research*, 27(4), 729-731.

- Pedraza-Diaz, S.; Amar, C.; Nichols, G.L. and McLauchlin, J. (2001).** Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg. Infection. disease's*. 7: 49–56
- Pelt-Verkuil;Elizabethvan;Belkum; Alex van; HaysandJohn P. (2008).** Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. edition. Hardcover – 1600.
- Pereira SJ, Ramirez NE, Xiao L, Ward LA (2002)** Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *Journal Infection disease's* 186(5):715–718. doi:10.1086/342296
- Pettoello -Mantovani, M. DiMartino,L. Dettori,G. Vajro,P. Scotti,S. & Guandalini,S. (1995).** Asymptomatic carriage of intestinal *Cryptosporidiosis* in immunocompetent and immunodeficient children.*Pediat.inf.Dis.*14(12):1042-1047.*Challenges journal .Appl.Biology.*,40: 2659 – 2667.
- Pifer , R & Yarovinsky , F. (2011).** Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans . *Trends in Parasitology* , 27 : 388-393.
- Pohlenz, J.;Moon,H.W.; Cheville, N.E. and Bemrick, W.J.(1978).** *Cryptosporidiosis* as a probable factor in neonatal diarrhea in calves *Journal of the American.Vet. Medical.Assoc.*, 172:452-457.
- Pollok, R.C. McDonald , V. Kelly, P. & Farthing, M. J. (2003).** The role of *Cryptosporidium parvum*-derived phospholipase in intestinal epithelial cell invasion. *Parasitol. Res.* 90(3):181-186.
- Public Health Agency of Canada May 24, 2011** Control and Prevention, Parasites- *Cryptosporidium* Retrieved November 196-206.
- Putignani , L. ;Sanderson , S.J. Russo, C. ;Kissinger, J. Menichella, D. & Wastling, J. M .(2009)** Proteomic and Genomic Approaches to

---

understanding the power plant of *Cryptosporidium*. in: *Giardia* and *Cryptosporidium* from Molecules to Disease,339-343

- Raheem, H.H.(2012).**Sero-Epidemiological Study of *Cryptosporidium parvum* in Al-kut City.M.sc.Thesis.College of Science.University of Wasit. 82.
- Rahi A.,A. (2013).**Comparison among Modified Acid-Fast Stain and Some Immunological Methods in Diagnosis of *Cryptosporidium parvum* in Kut City, Journal of Wassit For Science and Medicine, Vol. 6, No.1, (12-20)PP.
- Ramirez, N. E., Ward, L. A., & Sreevatsan, S. (2004).** A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and infection*, 6(8), 773-785.
- Razakandrainibe, R., Hadji, E., Diawara, I., Costa, D., Gargala, G. (2019).** Common occurrence of *Cryptosporidium* in asymptomatic and symptomatic calves in France To cite this version: HAL Id: hal-02316690 Common occurrence of *Cryptosporidium* in asymptomatic and symptomatic calves in France.
- Redlinger, T., Corella-Barud, V., Graham, J., Galindo, A., Avitia, R., and Cardenas, V. (2002).** Hyperendemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States-Mexico border. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 66(6), 794-798.
- Richard, E. Robert,M. & Ann , M.(1996).** Cryptosporidiosis and Coccidial Infection.Nelson Textbook of of pediatrics .15th ed .W.B .Saunders company London, p:968-97.

- Rider, S.D & Zhu , G. (2008)** .*Cryptosporidium* spp. in: Khan ,N . A., editor "Emerging Protozoan Pathogens". Taylors & Francis Group., USA.:193- 225.
- Rimhanen-Finne, R. (2006).** *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection in environmental and faecalsamples. Hall, Fabianinkatu 33, Helsinki, on January 14.
- Rossignol, J. (2010)** *Cryptosporidium and Giardia*: Treatment options and prospects for new drugs. *Exp.Parasitol.*124:45-5300.
- Rossignol, JF.;Ayoub, A.andAyers MS.( 2001).** Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. *journal Infection Disease.* 184(1):103.
- Ryan ,K. J. & Ray, C. G. (2004).**Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Disease. 4<sup>th</sup>. Ed. McGraw-Hill New York 701-730. CHAPTER 51.
- Ryan UN, Fayer R, Xiao L. (2014);** *Cryptosporidium species* in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitol.* 141:1667–1685.
- Ryan, E. T., Naumova, E., Karim, M. M., Borad, A. J., Rao Ajjampur, S. S., Ward, H. D., ... Wang, D. (2012).** Systemic Antibody Responses to the Immunodominant p23 Antigen and p23 Polymorphisms in
- Ryan, U. (2010).** *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental parasitology*, 124, 113-120.
- Samie, A., Guerrant, R. L., Barrett, L., Bessong, P. O., Igumbor, E. O., & Obi, C. L. (2009).** Prevalence of intestinal parasitic and bacterial pathogens in diarrheal and non-diarrheal human stools from Vhembe district, South Africa. *Journal of health, population, and nutrition*, 27(6), 739.

- Saneian, H., Yaghini, O., Yaghini, A., Modarresi, M. R., & Soroshnia, M. (2010).** Infection rate of *Cryptosporidium parvum* among diarrheic children in Isfahan. Iranian journal of pediatrics, 20(3), 343.
- Santín, M. and Trout, J.M. (2008)** Livestock. In *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis ed. pp. 451–483. Boca Raton: CRC Press.
- Santín, M., Trout, J. M., and Fayer, R. (2008).** A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. Veterinary parasitology, 155(1-2), 15-23.
- Sayyari, A.A., Imanzadeh, F., Bagheri Yazdi, S.A., Karami, H. and Yaghoobi, M. (2005).** Prevalence of intestinal parasitic infections in the Islamic Republic of Iran. Eastern Mediterranean Health Journal 11(2): 377-383.
- Schmidt, G.D., & Roberts, L.S. (2000).** Foundations of Parasitology, McGraw-Hill International Editions: p 338-342.
- Sevinc, F.; Uslu, U. & Derinbay, Ö. (2005).**The Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in Lambs Around Konya. Turk journal. Vet. Anim. Science., 29:1191-1194.
- Shinta, T. Oda, T. & Arizono , N. (2004)** Imported cryptosporidiosis eport of a case in Japan and of the literatuel . Kansen . Shogaku. Zasshi., 68(7):941-945.
- Singh, I., Carville, A., & Tzipori, S. (2011).** Cryptosporidiosis in rhesus macaques challenged during acute and chronic phases of SIV infection. AIDS research and human retroviruses, 27(9), 989-997.
- Smith H.V.; Nichols R.A.B. & Grimason, A.M. (2005)** *Cryptosporidim* excystation and invasion: getting to the guts of the matter" Trends Parasitol. 21, 133-142.



- Snelling ,WJ.; Xiao L.; Ortega-Pierres, G.; Lowery, CJ.;Moore, JE.;Rao JR.et al. (2007).** Cryptosporidiosis in developing countries journal. Infection Dev Ctries;1:242-56
- Snodgrass, D. R.; Angus, K.W. & Gray, E. W. (1984).**Experimental Cryptosporidiosis in Germfree Lambs. journal.comparacens.pathalogy.,94(1)141-152..
- Sparks, H., Nair, G., Castellanos-Gonzalez, A. & White, A. C. 2015.** Treatment of Cryptosporidium: what we know, gaps, and the way forward. Current tropical medicine reports, 2, 181-187.
- Sponseller, J. K., Griffiths, J. K., & Tzipori, S. (2014).** The evolution of respiratory Cryptosporidiosis: evidence for transmission by Clinical microbiology reviews, 27(3), 575-586.
- Squire, S. A., & Ryan, U. (2017).** *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. Parasites and Vectors, 10(1), 1–32.
- Sunnotel, O., Verdoold, R., Dunlop, P. S. M., Snelling, W. J., Lowery, C. J., Dooley, J. S. G., Moore, J. E., & Byrne, J. A. (2010).** Photocatalytic inactivation of *Cryptosporidium parvum* on nanostructured titanium dioxide films. Journal of Water and Health, 8(1), 83–91.
- Syeda,S.H.; Sikandar, K. S.; Rehman,U. K.; Ziaullah , M. A. S. andShahzad,M. (2014).** *Cryptosporidium*: A Diarrhoea Causing Parasite. .Canadian Journal of Applied Sciences. 1(4): 18-25; January,. ISSN 1925-7430.
- Tavares, RG.;Staggemeier, R.; Borges, ALP. ; Rodrigues, MT.;Castelan LA.; Vasconcelos, J. etal. (2011).** Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection.The Journal of Venomous Animals and Toxins ISSN 1678-9199 vol.17 , issue 3 .P. 239-248.

- Thompson, R. A. (2005).** The zoonotic transmission of Giardia and Cryptosporidium. International journal for parasitology, 35(11-12), 1181-1190.
- Thompson, R. A., Koh, W. H. & Clode, P. L. (2016).** *Cryptosporidium*—What is it? Food and Waterborne Parasitology, 4, 54-61.
- Tinuade, O., John, O., Saheed, O., Oyeku, O., Fidelis, N., & Olabisi, D. (2006).** Parasitic etiology of childhood diarrhea. The Indian Journal of Pediatrics, 73(12), 1081-1084.
- Topuchain , A . Huneau , J . F . Barbot , L. Rome , S. Gobert , J . G. Tome, D. Kapel , N . (2003) .**Evidence for the Absence of an Intestinal Adaptive Mechanism to Compensate for *C . parvum* Induced Aminoacid Malabsorption in Suckling Rats.
- Trisha, J.R.; Elizabeth, A.C.; Charlott, T. & Kirk,E.S.(2012).**Evaluation of the positive predictive value of rapid assays used by clinical laboratories in Minnesota for the diagnosis of Cryptosporidiosis. Oxf. journal.,50:1.
- Tzipori , S. (1988).** Cryptosporidiosis in perspective . Advance. Parasitol. Ed. Baker and Muller . Academic Press . 27 : 63 – 128.
- Tzipori, S. & Campbell, I. (1981).** Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. journal Clinical Microbiology 14: 455-456.
- Umemiya R., Fukuda M., Fujisaki K. et al. (2005).** Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice JParasitol 91(5):1034-1039
- Valones M.A. A.; Guimarães , R. L.;Brandão , L. A. C.; De Souza , P. R. E.; Carvalho, A.A. T.and Crovela, S. (2009).** Principles and Applications of Polymerase Chain Reaction in Medical Diagnostic Fields. Brazilian. Journal of Microbiology 40:1-11. ISSN 1517-8382.

- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008).** Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer Science & Business Media.
- Vandepitte, J., Roberechts, J. and Vanneste, S. (1985)** .Cryptosporidium causing severe enteritis in a Belgian immunocompetent patient . Arch. Clinical. Belg. 40 : 43 -47 .
- Waldron, L. S., Dimeski, B., Beggs, P. J., Ferrari, B. C., & Power, M. L. (2011).** Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. Appl. Environment. Microbiology., 77(21), 7757-7765.
- Wamae, C. N., Wanyiri, J. W., Kanyi, H., Steen, A., Ngugi, P., O'Connor, R. Waithera, T. (2014).** Cryptosporidiosis in HIV/AIDS Patients in Kenya: Clinical Features, Epidemiology,
- Wanyiri, J. W., Kanyi, H., Maina, S., Wang, D. E., Steen, A., Ngugi, P., Kamau, T., Waithera, T., O'Connor, R., Gachuhi, K., Wamae, C. N., Mwamburi, M., & Ward, H. D. (2014).** Cryptosporidiosis in HIV/AIDS patients in Kenya: Clinical features, epidemiology, molecular characterization and antibody responses. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 91(2), 319–328.
- Wanget, R., Li, G., Cui, B., Huang, J., Cui, Z., Zhang, S., ... & Wang, M. (2014).** Prevalence, molecular characterization and zoonotic potential of *Cryptosporidium spp.* in goats in Henan and Chongqing, China. Experimental parasitology, 142, 11-16.
- Weitzel, T., Dittrich, S., Möhl, I., Adusu, E., & Jelinek, T. (2006).** Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. Clinical Microbiology and Infection, 12(7), 656-659.

- White , A. C. Chappell , C.L. and Hayat, C. S. (1994).** Paromomycin for cryptosporidiosis in AIDS ; A prospective Double blind trial , Journal . Infection . 170 ; 419 42
- White,T.J.(1996).**The Future of PCR Technology.Diversification of Technologies and Applications.Trends Biotechnol.,14(12):478-483.
- WHO, (2009).** Risk Assessment of *Cryptosporidium* in Drinking Water. WHO/HSE/WSH/09.04 .Geneva ,WHO:134.
- Widmer. G.; Ras, R.; Chalmers, RM.; Elwin, K.; Desoky, E.; Badawy, A.( 2015).**Xtrachromosomal DNA in the Apicomplexa. MicrobiolMolBiol Rev61 .Wilson, R. J. & Williamson, D. H. 1±16Apr;17(4):984-93. doi: 10.1111/1462-2920.12447. Epub.
- Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, . . . Lal A.A. (2001)** Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. Journal Infection Diseases ;183(3):492-497. doi:10.1086/318090
- Xiao, L. & Cama, V. (2006).***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in: Ortiga ,Y. editor."Food Born Parasitology". Springer Science .,USA:289.
- Xiao, L. (2010).** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update". Exp. Parasitol. 124: 80–89.
- Xiao, L. andCama V. (2007).***Cryptosporidium*. In P. R. Murray. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C..9<sup>th</sup>. ed., pp. 2122-2132.
- Xiao, L., and Ryan, U. M. (2008).** Molecular epidemiology. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, 2, 119-151.
- Yacoub, M. M. (2014).** Intestinal Protozoa and *Cryptosporidium* genotypes in North of West Bank/Palestine (Doctoral dissertation).
- Yang, Y., Zhou, Y., Cheng, W., Pan, X., Xiao, P., Shi, Y., Gao, J., Song, X., Chen, Y. & Jiang, Q. (2017).** Prevalence and Determinants of *Cryptosporidium* Infection in an Underdeveloped Rural Region of

Southwestern China. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 16-0732.

**Zou, Y., Ma, J. G., Yue, D. M., Zheng, W. B., Zhang, X. X., Zhao, Q., & Zhu, X. Q. (2017).** Prevalence and risk factors of *Cryptosporidium* infection in farmed pigs in Zhejiang, Guangdong, and Yunnan provinces, China. Tropical animal health and production, 49(3), 653-657.

الملاحق

**Appendixes**

## استمارة معلومات المريض

رقم العينة .....

تاريخ جمع العينة .....

جنس المريض .....

العمر .....

طبيعة السكن الريف ..... المدينة .....

المستوى المعاشي للأبوين فقير ..... متوسط ..... جيد .....

التحصيل الدراسي للأبوين الأم ..... الأب .....

المرضات المرافقات طفليات ..... فيروسات ..... بكتريا .....

مصدر مياه الشرب .....

نوع الاسهال ومدته .....

الاعراض .....

نتيجة الفحص المجهرى ايجابية ..... سلبية .....

## Summary

---

### Summary

The present study aimed to diagnose the *Cryptosporidium* parasite and identify the extent of the parasite's spread in people who suffer from diarrhea and its relationship to epidemiological factors in the holy Karbala Province using three different diagnostic methods. Microscopic examination, which includes staining the samples with the modified acid dye, as well as using the method of flattening with a sugar sheathers solution, immuno-chromatography examination using immunoassay slides, and molecular examination using the technique of polymerase chain reaction, the collection of samples was carried out in Al-Hussein Medical City and Karbala Teaching Hospital for children. So, in the laboratories of the College of Veterinary Medicine at the University of Karbala for the period from the beginning of September 2020 until the end of February 2021, 320 stool samples were collected from persons suspected of having the parasite (those with diarrhea and not infected) and who came to Imam Hussein Medical City and Karbala Teaching Hospital. For children, of both sexes, and with age groups from (1-50) years, this was done Each sample was divided into two parts, the first part was used to prepare moderately thick smears for examination with the modified acid dye and the second part was kept at a temperature of -20 for later use in the molecular examination, as the results of the microscopic examination using the modified acid dye showed that the number of infected samples reached 26 samples as the number of Males have 15 samples, while the number of females reached 11 samples and the overall infection rate was 8.1%, while the infection rate was lower by using immunological tests by 6.8%.

The incidence rate was affected by epidemiological factors below the probability level  $P \leq 0.05$ , as males recorded a higher rate of infection compared to females, as the infection rate reached 10% and 6.47%, respectively, while the infection rate recorded significant differences according to the type of housing, as the infection rate reached 12.2% in the countryside and in The city, the infection rate was 6.5%. As the current study recorded different infection rates according to the months of the year, the highest rate of infection was in the month of December by 16%, while the lowest injury rate was concentrated in the month of October and November by 1.8%, 4.7%, and the study recorded The highest rate of infection was in the age group (1-10) by 14.1%, while the current study did not record any infection in the age group (40-31). Drinking water sources played a role in the spread of the *Cryptosporidium* parasite, as the study showed significant differences in infection rates, as the infection rate for people who rely on tap water was 18.9%, while the lowest rate for people who used sterile water for



## Summary

---

drinking was 4.8%. As for the companion parasites, the current study recorded that the most associated parasite is *Entamoeba histolytica* by 3.4%, while the appearance of *Girdia lamblia* parasite was less by 2.1%.

A molecular assay was used on the second part of the samples, which was kept at a temperature of -20, for the purpose of confirming infection in the positive samples and others, and to determine the accurate diagnosis of this parasite. Specific primers for the oocyst wall protein (*COWP*) gene were used, *Cryptosporidium* oocyst wall protein. Polymerization, the first stage was the polymerase chain reaction (PCR), where the DNA was amplified using specific primers and the reaction was accomplished using a thermocycler and under optimal conditions. The results revealed a single package (Single band in agarose gel) with weight Molecular 769 base pairs of nitrogenous bases in the DNA extracted from stool samples of people with *Cryptosporidium*, which is an indication of the patient's infection with the parasite, and the second stage in which the technique of nested polymerase chain reaction is used. By using two types of specific primers in the reaction (*COWP F* and *COWP R*), the DNA was amplified using specific primers and it was The reaction was carried out using a thermocycler device and under optimal conditions, the results showed the presence of one packet in the agarose gel with a molecular weight of 553 pairs of nitrogenous bases in the DNA extracted from the stool samples of people with *Cryptosporidium*, an indication of the patient's infection with the parasite, and the current study showed that the sensitivity The microscopy examination was less than the molecular examination, as the sensitivity of the microscopy examination reached 75%, while the sensitivity of the immunological examination was higher than that of the microscopic examination, and the sensitivity of the immunohistochemical examination was 88%.

It was concluded from this study that the *Cryptosporidium* parasite is one of the parasites that cause diarrhea in humans, especially children in Karbala Province. It can be diagnosed by several diagnostic methods, and the polymerase chain reaction method is one of the best diagnostic methods.

Ministry of Higher Education and Scientific Research  
University of Karbala  
College of Education for Pure Sciences  
Department of biology



**Microscopic and Molecular diagnosis of  
*Cryptosporidium parvum* in the Holy Karbala Province**

**A Thesis**

Submitted to the Council of College of Education for Pure  
Science, University of Kerbala in Partial Fulfillment of the  
Requirements for the Degree of Master in Biology /  
Zoology

By

**Ahmed Hamid Jassim Al-Morshedy**

(B.Sc., University of Kerbala, 2008)

Supervised By

**Prof. Dr.**

**Kawther Abdul-Hussain Mahdi Al-Mussawi**

Shawwal /1442 A.H.

May/ 2020 A.C.