المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٠، العدد ٢، ٢٠٠٦ (٢٠٣-٢١٢)

الكشف عن طفيلي الابواغ الخبيئة *Cryptosporidium spp* في حدائق حيوانات مدينتي الموصل ودهوك

وسن امجد احمد ألعبيدي
فرع الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، موصل، العراق

(الأستلام ٢٣ أيار ٢٠٠٦؛ القبول ٤ تشرين الأول ٢٠٠٦)

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة الكشف عن طفيلي الابواغ الخبيئة *Cryptosporidium spp* في عينات البراز المأخوذة من عدد من الحيوانات المرباة في حدائق الحيوانات لمدينتي الموصل ودهوك وكذلك الكشف عن وجود الطفيلي في عينات البراز للعمال القائمين على رعايتها في الحدائق ذاتها خلال عام 2002. استخدمت 4 من التقنيات المختبرية في التشخيص للكشف عن أكياس بيض طفيلي*Cryptosporidium spp* حيث بلغت نسبة الخمج الكلي في القرود، الغزلان، الببغاء، الفنجس والثعالب (54.5% , 46.4%, 41.6%, 80% ,71.4%)، على التوالي. في حين كانت نسبة الخمج الكلي في العمال 60%. تبين أن أكفاء تقنيات التشخيص هي تقنية التصبيغ بالصبغة الصامدة للحمض المحورة الحارة والتي بلغت 100% في جميع عينات البراز المفحوصة تلتها تقنية التصبيغ بالا يودين ,تقنية التطويف بالمحلول السكري المشبع ولم تظهر تقنية الترسيب بالفورمالين كفاءة جيدة في الكشف عن وجود أكياس بيض طفيلي في عينات البراز. مميزات أكياس بيض الطفيلي كانت متباينة حسب التقنية المستخدمة في فحص عينات البراز,لكن لم يظهر وجود فرو قات شكلية في أكياس بيض الطفيلي وكان معدل أحجام أكياس البيض المقاسة ضمن حدود قياس أكياس بيض طفيلي *Cryptosporidium spp*

DETECTION OF CRYPTOSPORIDIUM *SPP* IN ZOO OF MOSUL AND DOHUK CITIES

W. A. Ahmed Al-Obaidi

Department of microbiology, College of Veterinary Medicine,
University of Mosul, Mosul , Iraq

ABSTRACT

This study includes detection of *Cryptosporidium spp* from fecal samples taken from different animals in Duhok and mosul Zoo , and parasite from workers in these Zoo in 2002 .The total infected percentage reach to (54.5 % , 46.6 % , 41.6 % , 80 % , 71.4, 60 %) in Monkeys, Deer, Parrot, Finch, Fox and Zoo Workers. Four laboratory method were used for diagnosing parasite oocysts, The results showed that efficient diagnostic method was modified acid fast stain method (100%), followed by Iodine staining method and flotation in saturated

sugar solution method. While, formalin sedimentation method gave low confidence for diagnosis the oocysts of parasite in fecal samples. Features of oocysts were varied according to the technique was used for examination of fecal samples, but there are no morphological differences appeared in oocysts. The average of oocysts sizes were shown to be within the normal range of oocysts of *Cryptosporidium spp*. The average of oocyst sizes was shown to be within the measure of oocyst of *Cryptosporidium spp.*

المقدمة

يعد داء الأبواغ الخبيئة Cryptosporidiosis من الأمراض الطفيلية المشتركة والواسعة الانتشار في مختلف أنحاء العالم. يسببه طفيلي من جنس*Cryptosporidium* الذي ينتمي إلى مجموعة الأوالي الاكرية (Coccidia) ويعتبر هذا الطفيلي مسببا للإسهال في الإنسان ومختلف الحيوانات (1) سجل الخمج بهذا الطفيلي في 7 رتب من اللبائن و 4 رتب من الطيور ورتبتين من الأسماك وفي رتبة واحدة من الزواحف ,لذا فقد ظهرت أهمية الأنواع المختلفة من اللبائن كمدى واسع من المضائف لطفيلي الابواغ الخبيئة (2, 3). تكمن خطورة الابواغ الخبيئة في الإنسان والحيوان على حد سواء في تعدد طرائق انتقاله من خلال تلوث الغذاء والماء فضلا عن كون أكياس بيض الطفيلي مقاومة لكثير من المعقمات والمطهرات ومعاملات المياه (4, 5). كما أن هناك العديد من المحاولات التي أجريت حول استعمال أكثر من 60 نوع من الأدوية كمحاولة لمعالجة المصابين بهذا الطفيلي والذين يشكون من العوز المناعي المكتسب (AIDS) لكنها لم تعطي نتائج ايجابية في العلاج ولا تزال البحوث جارية لإيجاد العلاج المؤثر ضد هذا الطفيلي (6).

إن ما كان يعتقد في السابق من أن الأنواع المختلفة من الطفيلي يخمج كل منها نوع واحد من المضائف دون غيره قد تم دحضه من خلال الدراسات الحديثة والمتعاقبة والتي أثبتت أن الطفيلي المعزول من احد المضائف الثديية يمكنه أن يخمج أنواع أخرى من هذه المضائف (7).

وبسبب الانتشار العالمي الواسع لطفيلي الابواغ الخبيئة ولخطورة هذا الداء على صحة الإنسان والحيوان ونظرا لندرة الدراسات والمعلومات المتوفرة عن وجود الطفيلي في الحيوانات والعمال القائمين على رعايتها في حدائق حيوانات مدينتي الموصل ودهوك وضعت هذه الدراسة.

المواد وطرائق العمل

أولا: جمع العينات:

تم جمع (65)عينة براز بصورة عشوائية من عدد من الحيوانات المرباة في حدائق حيوانات مدينتي الموصل ودهوك خلال عام 2002 فقد أخذت العينات كالأتي:

(11) عينة براز من القرود Monkeys من نوعي

Erythrocebus patas *patas monkeys*

Saimiri sciureu *squirvel monkeys*

و(15) عينة براز من الغزلان (Deer) من نوع *Tragulus napu*

و(12) عينة براز من طيور الببغاء (Parrot) من نوع *Psiltacula krameri*

و(20) عينة براز من طيور الفنجس (Finch) نوع *Chloebia gouldia*

و(7) عينة براز من الثعالب (Foxes) من نوع *Urocyon cinereoargenteus*

وتم كذلك اخذ (10) عينات براز من العمال المشتغلين والملامسين لهذه الحيوانات في حدائق الحيوانات نفسها، وضعت هذه العينات في عبوات بلاستيكية نظيفة حاوية على

محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم بتركيز 2.5 % كمادة حافظة ونقلت العينات إلى مختبر الطفيليات في كلية الطب البيطري –جامعة الموصل ووضعت في الثلاجة (4 ^{o}C) لحين فحصها وذلك للكشف عن وجود أكياس بيض طفيلي الابواغ الخبيئة *Cryptosporidium spp*.

ثانيا: الفحوصات المجهرية لعينات البراز:

تم الفحص المختبري لعينات البراز باستخدام أربع تقنيات مختبرية وكالأتي:

1- تقنية التصبيغ بالصبغة الصامدة للحمض المحورة الحارة (8)
Modified Acid Fast Stain –Kinyoun Hot Stain

2- تقنية التصبيغ بالايودين (9) Lugol's Iodine

3- تقنية التطويف بالمحلول السكري المشبع (10) Sheathers Sugar Flotation

4- تقنية الترسيب بالفورمالين (11) Formaline Sedimentation

ثالثا: تقدير الإصابة بطفيلي *Cryptosporidium* في عينات البراز المفحوصة: تم اعتبار الحالات المفحوصة موجبة عند إعطاءها نتيجة ايجابية لأحدى التقنيات المذكورة سابقا أو أكثر المستخدمة في تشخيص الطفيلي.

رابعا: تقييم كفاءة تقنيات التشخيص المختبرية المستخدمة:
Evaluation of Diagnostic Techniques

تم تقييم كفاءة هذه التقنيات حسب الأعداد والنسب المئوية الموجبة للخمج بالطفيلي لكل تقنية مستخدمة في التشخيص وباستخدام المعادلة التالية:

$$\text{كفاءة تقنية التشخيص} = \frac{\text{الأعداد الموجبة لكل تقنية} \times 100}{\text{الأعداد الموجبة الكلية}}$$

5- التصوير والقياس:

بعد أجراء الفحوصات المختبرية المستخدمة في الدراسة تم اختيار الشرائح الزجاجية وتم تصويرها باستخدام المجهر المزود بالة تصوير , وتم قياس حجم أكياس بيض الطفيلي والمذكورة لاحقا باستعمال المقياس الدقيق للعدسة العينية Ocular micrometer. وأجريت معايرته Calibration بالمقياس الدقيق للمسرح Stage micrometer وعلى قوتي تكبير 1000 X و400 X.

6- التحليل الإحصائي:

تم تحليل النتائج إحصائيا باستخدام اختبار X^2 , Fisher Exact Test (12)

النتائج

من الجدول رقم (1) تبين انه من خلال الفحص ألمختبري ل (75) عينة براز مأخوذة من أنواع مختلفة من الحيوانات (قرود، غزلان، ببغاء، فنجس، ثعالب) وكذلك من العاملين في حدائق الحيوانات أن نسبة ألخمج الكلي لكل نوع منها كالأتي(54.5% , 46.6% , 41.6% , 80% , 71.4%) ونسبةالخمج في العاملين كانت 60 %. خضعت جميع العينات لأربعة طرائق مختبرية للتحري عن وجود اكياس بيض الطفيلي فيها ومن خلال تحليل النتائج إحصائيا لوحظ عدم وجود فرق معنوي في نسب الخمج بالطفيلي والمشخص وفق هذه الطرائق الأربعة باستثناء طريقة الترسيب بالفورمالين التي أعطت

نتائج أوطأ من نتائج طريقة الصبغة الصامدة للحمض الحارة المحورة وبفرق معنوي باستخدام اختبار (X^2 Fisher Exact Test) عند مستوى معنوية $P<0.01$, $p<0.05$.

جدول 1: نتائج فحص عينات البراز المأخوذة من الحيوانات والعاملين على رعايتها ونسب وجود أكياس بيض الطفيلي بالتقنيات الأربعة.

ت	العينة	العدد الكلي للعينات	التطويف بالمحلول السكري المشبع		التصبيغ بالصبغة الصامدة للحمض الحارة المحورة**		التصبيغ بالايودين		الترسيب بالفورمالين*	
			عدد النماذج الموجبة	%	عدد النماذج الموجبة	%	عدد النماذج الموجبة	%	عدد النماذج الموجبة	%
١	القرود	11	4	36.3	6	54.5	5	45.5	2	18.1
٢	الغزلان	15	3	20	7	46.6	4	26.6	1	6.6
٣	الببغاء	12	3	25	5	41.6	4	33.3	2	16.6
٤	الفنجس	20	10	50	16	80	13	65	6	30
٥	الثعالب	7	3	42.8	5	71.4	2	28.5	–	–
٦	العاملين	10	2	20	6	60	3	30	1	10
	المجموع	75	25		45		31		12	

لا يوجد فرق معنوي بين نسب الخمج عند مستوى معنوية $p<0.01$ عدا * الترسيب بالفورمالين و** التصبيغ بالصبغة الصامدة للحمض الحارة المحورة عند مستوى معنوية $P<0.05$

أظهرت تقنية التصبيغ بالصبغة الصامدة للحمض المحورة كفاءة تشخيصية 100% في الكشف عن جميع الحالات الموجبة وسجلت فرو قات معنوية بين كفاءة الطرائق المستخدمة في التشخيص ,وكما هو موضح في الجدول رقم (2).

جدول (2): النسب المئوية لكفاءة كل تقنية من التقنيات المختبرية الأربعة المستخدمة في تشخيص طفيلي*Cryptosporidium spp*.

ت	التقنية	الأعداد الموجبة الكلية	الأعداد الموجبة لكل تقنية	النسبة المئوية لكفاءة كل تقنية
١.	التطويف بالمحلول السكري المشبع	45	25	55.5 % *x
٢.	التصبيغ بالصبغة الصامدة للحمض الحارة المحورة	45	45	%100
٣.	التصبيغ بالايودين	45	31	* %68.8
٤.	الترسيب بالفورمالين	45	12	ox*%26.6

ox* فرق معنوي عن طريقة التطويف بالمحلول السكري المشبع.
* فرق معنوي عن طريقة الصبغة الصامدة للحمض الحارة المحورة P<0.001
x* فرق معنوي عن طريقة التصبيغ بالايودين P<0.001

ومن الجدول رقم (3) لوحظ تباين في مميزات أكياس بيض الطفيلي التي ظهرت في كل تقنية.

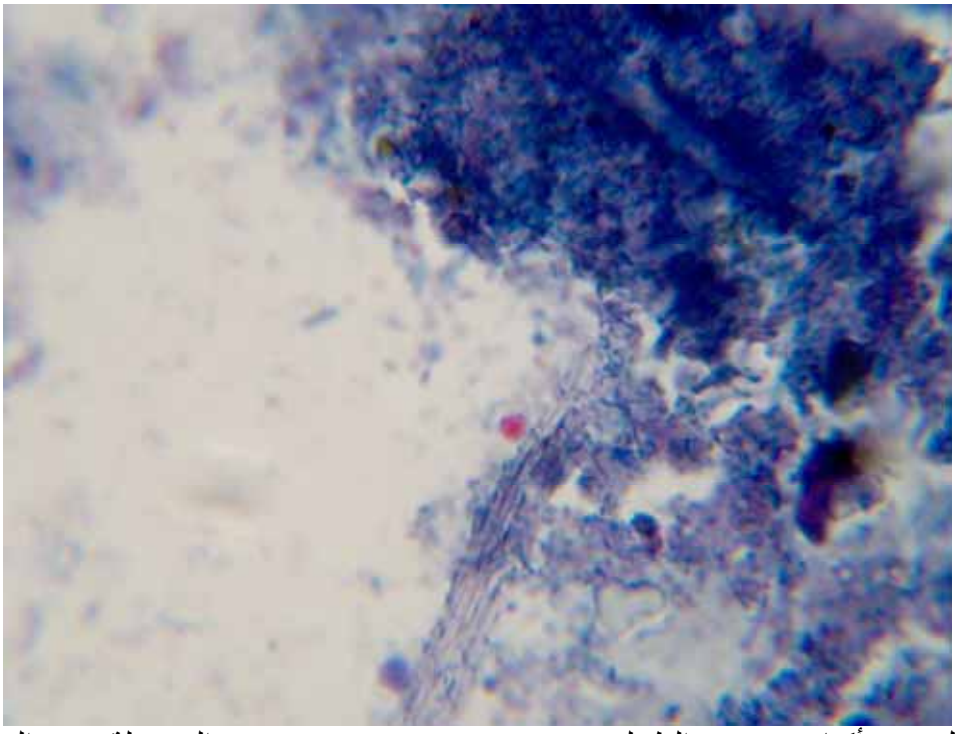
جدول 3: مميزات أكياس بيض طفيلي*Cryptosporidium spp* باستخدام التقنيات الأربعة.

ت	التقنية	مميزات أكياس بيض الطفيلي
1.	التطويف بالمحلول السكري المشبع	ظهرت بشكل أجسام مضيئة شفافة ذات وسط براق
2.	التصبيغ بالصبغة الصامدة للحمض الحارة المحورة	ظهرت الأكياس بلون احمر غامق
3.	التصبيغ بالايودين	ظهرت بلون بني فاتح وتكون محاطة بهالة مضيئة
4.	الترسيب بالفورمالين	ظهرت بلون رمادي فاتح محاط بغلاف رمادي داكن

تبين من خلال هذه الدراسة عند استخدام أربعة تقنيات في الكشف عن الطفيلي في العينات عدم وجود فرو قات شكلية لأكياس بيض الطفيلي المأخوذة في نماذج البراز للحيوانات والعاملين الملامسين لها وظهرت الأكياس بشكل كروي إلى بيضوي صغير إلى كبير الحجم لجميع المضائف المفحوصة ,كما أن قياس أبعاد أكياس بيض الطفيلي المشخصة في العينات المفحوصة كانت كما في الجدول رقم (4)، شكل (1)، شكل (2).

جدول 4: قياسات أحجام أكياس بيض الطفيلي المشخصة في براز الحيوانات المفحوصة والعاملين عليها.

ت	المضيف	المعدل (µm) الطول x العرض	المدى(µm) الطول x العرض
١.	القرود	4.5×5.5	(3-5.3×3.8-6)
٢.	الغزلان	4.5×5.5	(4.2-5.7×5.3-5.7)
٣.	الببغاء	4.7×5.7	(4.2-5.3 ×4.5 - 6)
٤.	الفنجس	4.6×6.2	(4.5-4.8×5.6-6.3)
٥.	الثعالب	4.7×5	(3.7-5.9 × 3.7-5.9)
٦.	العمال	5.6×6.4	(5-6.5 ×6.6 - 8.1)



الشكل 1: أكياس بيض الطفيلي*Cryptosporidium spp* المعزولة من العينات المفحوصة والمصبوغة بالصبغة الصامدة للحمض المحورة الحارة (قوة التكبير X400, X1000).

الشكل 2: أكياس بيض الطفيلي*Cryptosporidium spp* المعزولة من العينات المفحوصة والمصبوغة بتقنية التصبيغ بالأيودين (قوة التكبير X400,X1000).

المناقشة

إن أهمية الكشف عن طفيلي الابواغ الخبيئة *Cryptosporidium spp* في براز الحيوانات المرباة في حدائق الحيوانات تكمن في إمكانية نقل أكياس بيض الطفيلي إلى العاملين والمشتغلين والزوار الملامسين لهذه الحيوانات في هذه الحدائق وذلك لكون الطفيلي فاقد الخصوصية للمضيف (7, 13).

إن الإصابة في الإنسان خاصة الأطفال بطفيلي *Cryptosporidium parvum* تكون ناجمة

عن تلامسهم مع حيوانات الزينة (الكلاب والقطط) والتي كانت مصابة بالطفيلي نفسه (14) في حين سجل الباحث (15) حالة إصابة واحدة ب *Cryptosporidium baileyi* في شخص مثبط المناعة (ImmunoComporised person) نتيجة لتلامسه مع طيور كانت مصابة بالطفيلي.

وقد أجريت دراسة مماثلة لهذه الدراسة الحالية في حديقة الحيوان من قبل (16) لمعرفة مدى إصابة حيوانات ذوات الدم البارد والعمال المخالطين لهم بطفيلي الابواغ الخبيئة حيث سجلت نسبة خمج 20 % في التمساح و11% في أولئك العمال. وقد أوجدت نفس الدراسة إمكانية أجراء العدوى الصناعية لفئران سويسرية بيضاء اللون بالطور المعدي للطفيلي (أكياس البيض المتبوغة) والمعزولة من الإنسان والتمساح ألنيلي من خلال إمكانية انتقال الطفيلي بين الإنسان وهذه الحيوانات .وهناك دراسة أخرى قام بها(17) عن مدى إصابة أكلات اللحوم الأسيرة بحديقة حيوان في محافظة الجيزة بمصر بالطفيليات المعوية ومنها طفيلي الابواغ الخبيئة حيث كانت نسبة خمج هذه الحيوانات 17%.

ونسبة خمج العمال القائمين على رعايتها كانت 24.7%. ومن هنا تتجلى أهمية التعرف على وجود أكياس بيض الطفيلي ضمن المديات الواسعة من المضائف ومن خلال إجراء هذه الدراسة تبين أن نسبة الخمج الكلية بالطفيلي في براز القرود كانت 54.5%. وعند

مقارنة هذه النتيجة مع ما قد تم تسجيله في كينيا من قبل (18)في القرود حيث كانت نسبة الخمج 81.7%. إن هذا الاختلاف يعزى إلى أن القرود في هذه الدراسة الحالية مرباة في أقفاص خاصة معدة لهذا الغرض وبمعزل عن بقية حيوانات الحديقة الأخرى , والتي تلعب دور مهم في نقل الطفيلي من خلال تلوث مياه الشرب والطعام ببراز هذه الحيوانات لو أنها تعيش معا كما في الدراسة السابقة.

تبين من خلال نتائج هذه الدراسة وجود اختلاف في كفاءة تقنيات التشخيص المجهرية المستعملة وعدت الحالة كحالة إصابة عند إعطاءها نتيجة موجبة لأحدى او أكثر من التقنيات المستخدمة , ولغرض مقارنة كفاءة هذه التقنيات وجد أن أكثر التقنيات التي أعطت نتائج موجبة هي تقنية الصبغة الصامدة للحمض المحورة حيث بلغت 100% وعدت معيارا للمقارنة ببقية التقنيات الأخرى, وباستعمال هذه الصبغة لوحظ انه من السهل تمييز الطفيلي عن الخمائر والجراثيم التي تاخذ

لون الصبغة المغايرة وبهذا يوفر وقت عند الفحص ويمكن الاحتفاظ بالمسحة المصبوغة الموجبة لفترة أطول على الرغم من أنها تحتاج إلى وقت أطول عند تحضير المسحة وهذا يتفق لما أشار إليه كلا من (19, 20, 21)، أما (22) فقد ذكر إن تقنية التصبيغ بالايودين هي أكفا من تقنية التصبيغ بالصبغة الصامدة للحمض المحورة الحارة.

يكمن ضعف كفاءة الترسيب بالفورمالين في الكشف عن وجود أكياس بيض طفيلي الابواغ الخبيئة الموضح في هذه الدراسة يكون ناتجا عن عدم وضوح وتمييز شكل الطفيلي من ناحية اللون فضلا عن إن هذه التقنية لا يمكنها الكشف عن الإعداد القليلة لأكياس بيض الطفيلي (23).

أما بالنسبة لاشكال أكياس بيض الطفيلي فقد ظهرت بأشكال دائرية او بيضوية مع عدم وجود فروقات شكلية لأكياس بيض الطفيلي المأخوذة من نماذج البراز للحيوانات والعمال الملامسين لها والمصابين بهذا الطفيلي حيث كانت قياساتها ما بين (6-4µm) وهذا يقع ضمن الحدود الطبيعية لقياسات أكياس بيض الطفيلي(24). وهذا يؤكد وجود علاقة بين الإصابة في الحيوانات المفحوصة في هذه الدراسة والعمال الملامسين لها.

المصادر

1. Radostits OM , Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Cryptosporidiosis in Veterinary medicine. A text book of the disease of cattle, Sheep, pigs and horses. 9th ed ,WB Saunders CO 2000.
2. O'Donoghue PJ, De Saram, WG, Paull, KL and Medermatt S. *Cryptosporidium* infection in birds and mammals and attempted Cross-transmission studies. Vet Parasitol 1987; 26: 1-11.
3. Sturdee AP, Chalmers R M and Bull SA. Detection of *cryptosporidium.* Oocysts in wild mammals of main land .Britain Vet Parasitol. 1999; 80: 273.
4. Shaltout FA. Protozoal food borne pathogens in some meat products. Ass Vet Med J 2000 ; 42: 54-59.
5. Laberge I, Griffiths M W and Griffiths U W. Review article prevalence Detection and controle of *Cryptosporidium parvum* in food. Int J Food Microbiology 1996 ; 32: 1-26.
6. Uip DE, Lima ALL, Amato US, Boulos U, Neto VA, David DB. Roxithromycin treatment for diarrhea caused by *Cryptosporidium spp.* In: patients with AIDS. J Antimicrobial Chemotherapy 1998; 41: 93-97.

7. Xiaol Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health . Clin. Microbiol Rev. 2004; 17: 72-97.
8. Baron EJO, Peterson land Finegold S M. Diagnostic Microbiology, 9th ed, Mosby-year Book. Inc St Louis 1994: 792.
9. Ma P and Soave R. Three-step stool examination for crytospridiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. J Infect Dis 1983; 147: 24-28.
10. Anderson B C. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. JAMA 1981; 178: 1982-1984.
11. Garcia L S, Bruckner D A, Brewer T C Shimiz U. Techniques for the recovery and identification of *cryptosporidium* oocysts from stool specimens. J Clin Microbiol 1983; 18: 185-190.
12. Bruning L J and Kintz B L. Computational hand book statistics, 2nd ed, Scott Foresman and Company, England. 1977; pp: 233-237.
13. Fayer R, Speer G A, Dubey J P. General biology of *Cryptosporidium*. In: Cryptosporidiosis of man and animals, CRC Press. Boca Raton, Florida, USA 1990; 1-30.
14. Casemore DP, Wright SE, Coop RL. Cryptosporidiosis–human and animal Epidemiology. In : Fayer R .*Cryptospridium* and Cryptosporidosis, CRS Press, Boca Raton, USA 1997; PP: 65-92.
15. Districh O, Palkovic L, Sterba J, Prokopic J, Loudova J, Giboda U. The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. Parasitol Res 1991; 77: 44.
16. Siam M A, Salem GH, Ghonem NH, Michael S, El-Rafey AH. Cryptosporidia in ectotherms and human contacts. Ass Vet Med J 1994a; 32: 125-130.
17. Siam M A, Salem G H, Ghoneim N H, Mi Chael S A El- Rafay M A H. A public health importance of enteric parasitosis in captive carnivora. Ass Vet Med J 1994 b; 32: 131-140.
18. Muriuki S M K, Farah I O, Kagwiria R M, Chai D C, Njamunge G, Suleman M and Olobo J C. The Presence of *Crptosporidium* oocysts in stool of clinically diarrheic and normal non-human primates in Kenya. Vet Parsitol 1997; 72: 141-147.
19. Casemore D P, Armstrong M and Jackson B. Screening for *Cryptospridium* In stools. The Lancet 1984; 734-735.
20. Gardiner C H, Fayer R, Dubey J P. An Atlas of protozon parasites in animals tissues. Agricultural Research Service, USA 1988; PP: 36.
٢١. البكري ,هيثم صديق عبد الله. الاولي الطفيلية للجنسين ايمريا وكربتوسبوريديوم في المعز في محافظة نينوى. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل٢٠٠٢.
٢٢. خليل ، ليان ياسين. مقارنة كفاءة بعض الاختبارات التشخيصية لداء الابواغ الخبيئة في الحملان والاطفال في محافظة نينوى. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل٢٠٠٠.
23. Webster K A , Green JA, Dawson C, Giles M, Catchpole J. Diagnostic Methods For the detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in faeces. J Proto Res 1996; 6: 113-120.
24. O'Donoghue P J .*Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and Animals. Int J Parasitol 1995; 139-195.