ISSN: (3007-0384)
E-ISSN: (3007-0392)
مجلة وهج العلوم للعلوم الصرفة
المجلة متاحة على الرابط
https://uomosul.edu.iq/womeneducation/jwups/

Molecular Study of *Cryptosporidium parvum* Parasitic Strains Isolated from Some Mosul City Hospitals

Heba Q. M. Al, Obaidi [(1)]*, Firas M.B.Alkhashab[(2)], Hiyam A. I. Al-Tai[(3)]

[(1,2)] **Department of Biology, College of Education for Girls, University of Mosul, Mosul-Iraq,**
Department of Biology, College of Sciences, University of Mosul, Mosul-Iraq
***Corresponding author e-mail:** Hibba0bide94@gmail.com

***Keywords*:**
Cryptosporidosis, the genetic tree of the cryptosporidium parasite.

A R T I C L E I N F O

Article history:
Received : 08/06/2023
Accepted : 25/07/2023
Available online : 01/08/2024
Email:
journal.purescience.ge @uomosul.edu.iq

A B S T R A C T

The current study aimed to diagnose Cryptosporidium parvum and identify the extent of its prevalence in people suffering from diarrhea, especially children under five years, this is through microscopic diagnostic methods using modified MZN and gimsa stain and the use of molecular diagnostic technology, as the study showed the infection rate by (37.71) % (43) samples of examined stool samples by using microscopical diagnosed methods. In addition to the results of molecular examination that were carried out using the polymerase reaction technique for 25 stool samples out of (114) samples (25 positive samples and 89 negative samples) microscopically to confirm the accuracy of the diagnosis by microscopic examination, as it was noted that there were infections with the Cryptosporidium parasite by (21.92) and DNA sequencing was performed for samples diagnosed with the Cryptosporidium parasite to show new isolation for the first time in Nineveh Governorate and was registered in the National Center for Genetic Information NCBI with the serial number 757376.

© 2024JWUPS, College of Education for Girls, University of Mosul.

Alma' rifa Journal of Humanities
Alma' rifa Journal of Humanit

دراسة جزيئية لسلالات طفيل *Cryptosporidium parvum* المعزولة من بعض مستشفيات مدينة الموصل

هبه قاسم محمد العبيدي[(1)]*، فراس محمد بشير الخشاب[(2)]، هيام عادل إبراهيم الطائي[(3)]
[(1،2)] قسم علوم الحياة، كلية التربية للبنات، جامعة الموصل، الموصل، العراق
[(3)] قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة:

هدفت الدراسة الحالية الى تشخيص هذا الطفيلي والتعرف على مدى انتشاره عند الاشخاص الذين يعانون من الاسهال خاصة الاطفال دون الخمس سنوات، وذلك من خلال طرق التشخيص المجهري باستخدام صبغتي الزيل نلسن المحورة والكيمزا واستخدام تقنية التشخيص الجزيئي اذ اظهرت الدراسة وجود اصابة بنسبة (37.71)% وبواقع (43) عينة من عينات البراز المفحوصة ومشخصة مجهريا , فضلا عن نتائج الفحص الجزيئي التي تمت باستخدام تقنية تفاعل البلمرة لـ 25 عينة براز من اصل (114) عينة (25عينة موجبة و89 عينة سالبة) مجهريا لتأكيد دقة التشخيص بالفحص المجهري اذ لوحظ وجود اصابات بطفيلي الابواغ الخبيئة بنسبة (21.92) وتم اجراء DNA Sequencing للعينات المشخصة بطفيلي الابواغ الخبيئة لتظهر عزلة جديدة ولاول مرة في محافظة نينوى وتم تسجيلها في المركز الوطني للمعلومات الوراثية NCBI بالرقم التسلسلي 757376.

الكلمات المفتاحية: داء الابواغ الخبيئة، الشجرة الوراثية لطفيلي البويغات الخبيئة.

المقدمة:

ان طفيلي البويغات الخبيئة يعد من الطفيليات الابتدائية احادية الخلية وهي من حقيقية النواة التي تعود الى شعبة Apicomplexa [1] ويشمل التطور الكامل لـ *Cryptosporidium* على التكاثر اللاجنسي وتكوين الامشاج وتشكل البويضة التي تحتوي على اربع بويغات Sporozoites التي تحدث داخل نفس المضيف [2] ، وهو المسبب الرئيسي لداء البويغات الخبيئة Cryptosporidiosis الذي يصيب الجهاز الهضمي والتنفسي لانواع من المضائف ومن ضمنها الانسان [3], [4] ، وايضا مسبب الاسهال المائي او الشحمي مع المغص وتعد الاصابة بالطفيليات المعوية كطفيلي البويغات الخبيئة من اهم المشكلات التي تعاني منها البشرية اذ يسبب الاسهال في الاطفال وكبار السن واحيانا تكون العدوى شديدة خاصة في الاشخاص ذوي المناعة الضعيفة اذ ان الافراد الذين يتميزون بالمناعة التامة فأن الطفيلي سوف يعيش لفترة قصيرة لان المناعة الخلوية والخلطية قادرة على مقاومة الاصابة واغلب الافراد ممن يمتلكون كفاءة مناعية لاتظهر لديهم اعراض المرض Asymptomatic carrier في حين يكون الخطر عند الاشخاص ذوي المناعة الضعيفة كالاطفال الرضع وايضا الاشخاص الذين يعانون من سوء التغذية والمصابين بالايدز فضلا عن اولئك الذين يتناولون ادوية مثبطة للمناعة Immunosuppressive Therapy لهذه الحالات معرضة للاصابة المزمنة بداء البويغات الخبيئة ومعرضين للجفاف وسوء الامتصاص وان اكثر من نصف الاصابات تنتقل بواسطة الماء وتبدأ الاصابة عند التعرض لأكياس البيض التي لها القابلية على بقائها قيد الحياة لفترات طويلة في البيئة لانها مقاومة للمطهرات المنزلية المعروفة وكذلك قدرتها على الانتقال والمرور من خلال عمليات المعالجة الفيزيائية للمياه [1], [5].

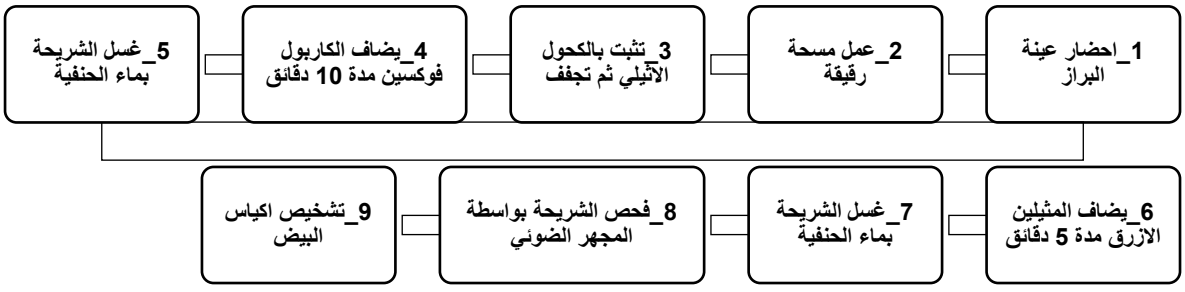
جمع العينات:

تم جمع عينات البراز من المرضى (الاطفال) ذكورا واناثا ممن راجعوا مستشفيات (ابن الاثير، الخنساء، الموصل العام) في محافظة نينوى وتم اجراء الفحوصات المختبرية الخاصة بكشف الطفيلي حيث تم جمع 114 عينة بحجم 15-20 غم ووضعت في عبوات بلاستيكية معقمة وذات غطاء محكم للحفاظ على الرطوبة ومنع جفاف العينة وكذلك تم تدوين عليها اسم المريض والعمر والجنس والعنوان ونقلها الى مختبر البحوث والدراسات العليا في كلية التربية للبنات /جامعة الموصل وبعدها تم فحص العينات عينيا وذلك عن طريق ملاحظة (اللون والقوام ورائحة الغائط ووجود وعدم وجود الدم والمخاط) ثم الانتقال للفحص المجهري بطريقتي صبغة الزيل نلسن المحورة وصبغة الكيمزا للتأكد من وجود الطفيلي اما ما تبقى من العينة يتم اجراء عليها طريقة التطويف للحصول على اكياس البيض ووضعت في انابيب معقمة وتم خزنها بإضافة محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم بتركيز 2.5% اذ اضيف الى كل مل من عينة الغائط 1 مل من المحلول وتم حفظ العينات في الثلاجة بدرجة حرارة 4 درجة مئوية لحين عزل DNA للطفيلي واجراء فحص تفاعل البلمرة المتسلسل PCR [6] .

طرق العمل:

1) الفحص المجهري

طريقة التصبيغ بصبغة الزيل نلسن المحورة حسب [7] ,[6] الشكل (1).



شكل (1) الخطوات المتبعة بصبغة زيل نلسن المحورة

بعد اجراء عملية التصبيغ بواسطة الزيل نلسن المحورة MZN **الصورة (1)** وتشخيص اكياس البيض ، ما تبقى من عينة البراز تدخل في مرحلة التطويف بمحلول شذر السكري حسب طريقة [8] .

الصورة (1) العدة المستخدمة في التصبيغ باستخدام صبغة الزيل نلسن المحورة MZN

2) الفحص الجزيئي:

اولا: استخلاص الحامض النووي من طفيلي Cryptosporidium spp : تمت طريقة العملAssay Procedure حسب تعليمات شركة Geneaid لاستخلاص الحمض النووي المثبتة على العدة (الكت) .

ثانيا: تحضير هلام الاكاروز وعملية الترحيل الكهربائي للـDNA

لترحيل الدنا والكشف عنه يتم تحضير هلام الاكاروز بتركيز 1% والحصول على هذا التركيز تتم اذابة 0.5 غم من مسحوق الاكاروز في (50) مل من X1 TBE واضافة 3 مايكروليتر من صبغة red safe يتم ذلك باستخدام مصدر حراري مع التحريك المستمر لحين الغليان و يترك ليبرد الى درجة حرارة (50-60) °م.

ثم يصب محلول الهلام في الحوض الخاص Tray بجهاز الترحيل بعد ان يتم تثبيت المشط الخاص لتكوين الحفر Wells عند اطراف الهلام مع مراعاة ان يكون الصب بهدوء لتجنب تكوين الفقاعات، وان تكونت يتم ازالتها باستخدام الماصة، ثم يترك الهلام حتى يتصلب.

بعدها يوضع الـ Tray في حوض الترحيل الكهربائي الحاوي على كمية مناسبة من محلول X1 TBE بعدها يتم رفع المشط بهدوء.

يتم تحضير عينات الترحيل بمزج (5) مايكروليتر من عينة الـ DNA مع (3) مايكروليتر من محلول التحميل. بعد ذلك يتم تشغيل جهاز الترحيل بامرار التيار الكهربائي بفرق جهد (5) فولت \ سم وتستغرق العملية (2-1.5) ساعة. بعد ذلك يتم تصوير الهلام تحت الاشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز تصوير الهلام Gel Documintation للتمكن من رؤية حزم الـ DNA وايضا ناتج تفاعل الـ PCR.

ثالثا: تفاعلات الـ PCR

يتم ضبط تركيز الدنا في كافة عينات الدراسة بالتخفيف بواسطة محلول TE بفر للحصول على التركيز المطلوب لاجراء تفاعلات الـ PCR وكان (100) نانوغرام \ مايكروليتر لكل عينة. اذ تم تحضير خليط التفاعل الرئيسي Master Reaction لكل تفاعل PCR وذلك بمزج عينة الدنا والبادئ الخاص لكل جين مع مكونات الـ Pre-mix داخل انبوبة الابندروف سعة 0.2 مل والمجهز من قبل شركة Biolaps الانكليزية تم تثبيت حجم التفاعل الى 20 مايكروليتر بالماء المقطر، ويتم نبذ المزيج في جهاز Microfuge لفترة بين (5-3) ثوان للتأكد من مزج مكونات التفاعل، ثم ادخلت انابيب

التفاعل في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler لغرض اجراء التفاعل التضاعفي باستخدام البرنامج الخاص لكل تفاعل، بعدها تم تحميل العينة في حفر هلام الاكاروز المحضر مسبقا بتركيز 2% مع اضافة الدليل الحجمي Ladder DNA المجهز من شركة Biolaps في احدى الحفر، بعد ذلك يتم ترحيل العينات بتشغيل جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis لمدة تتراوح بين (70-60) دقيقة بعد ذلك يتم تصوير الهلام باستخدام جهاز الـ Gel Documintation.

رابعا: التشخيص الجزيئي لطفيلي Cryptosporidium spp بالاعتماد على منطقة rDNA18

تم الكشف عن وجود المنطقة المضخمة اذ تم اضافة 4 مايكروليتر (100 nanogram) من الدنا القالب و1 مايكروليتر (10 picompl) من كل بادئ خاص بالجين الى محتويات الـ Master mix الجدول (1).

جدول (1) البادئات المستعملة لتضخيم جين الـCOWP لطفيلي البويغات الخبيئة

Primer	Sequence
Forward	5`- TGGCACCAGAATCAGCTGAA – 3`
Revers	5` - GACAGGTTGAGTTGGAGCAGA _ 3`

بعدها تم ادخال انابيب التفاعل في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler لإجراء التفاعل التضاعفي وباستخدام البرنامج الخاص للتفاعل الجدول (2).

جدول (2) البرنامج الخاص لتفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم في الدراسة الحالية

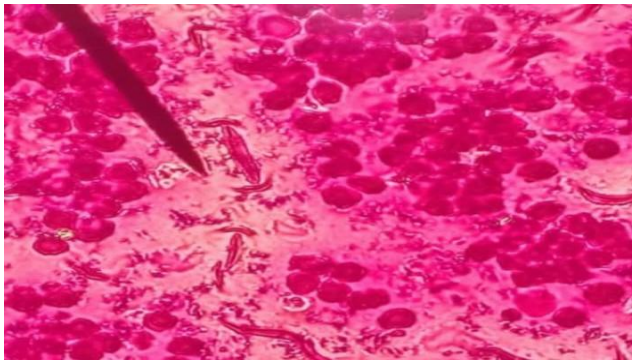
NO.	Stage	Temperature	Time	Cycle Number
1.	Initial denaturation	95	6 min.	1
2.	Denaturation	95	1.30 min.	35
3.	Annealing	60	1.30 min.	35
4.	Extension	72	2 min.	35
5.	Final extension	72	5 min.	1

تم تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية للعينات قيد الدراسة اذ تم ارسال نواتج تفاعل الـ PCR للعينات المذكورة سلفا مع البوادئ الخاصة بالحزمة الناتجة وتم قراءة التسلسل للجينات بالاعتماد على جهاز Genetic Analyzer 3130 المجهز من شركة Hitachi اليابانية.

وتم مطابقة التسلسلات الخاصة بالجينات مع تسلسلات الجينات الموثقة في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحياتية National Center Biotechnology Information NCBI وتم تحليل النتائج بالاعتماد على برنامج BLAST.

النتائج والمناقشة:

كانت نتائج الفحص المجهري لفحص 114 عينة غائط في مدينة الموصل وجود 43 طفلا مصاب بداء البويغات الخبيئة بنسبة (37.71%) بحسب الفحص المجهري بصبغة الزيل نلسن المحورة MZN **الصورة (2)** وكذلك اجريت عملية التطويف بمحلول الشذر السكري فكانت نسبة الاصابة (31.57%)



الصورة (2) أكياس البيض لطفيل Cryptosporidium parvum
المصبوغة بصبغة الزيل نلسن المحورة X100

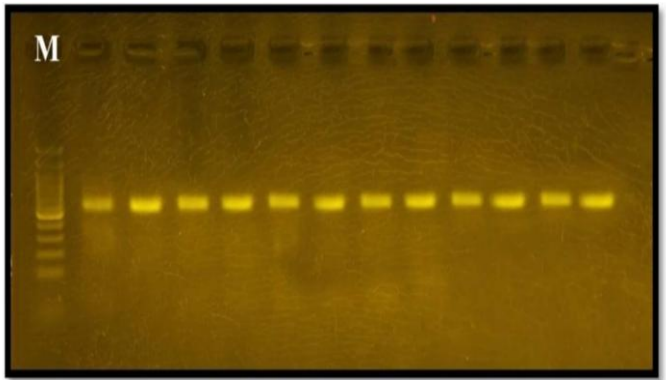
ولوحظ في نتائج الدراسة الحالية هنالك وجود اختلاف في نسب الاصابة في الاعمار ما بين عمر 5 اشهر و5 سنوات اذ سجلت اعلى نسبة اصابة بعمر (3-4) سنوات واقل نسبة كانت في الفئة العمرية (5 اشهر- سنة) اذ اتفقت مع دراسة [9]، اذ ان عامل العمر له دور في انتشار الطفيلي لان الجهاز المناعي لدى الاطفال غير مكتمل, وتعرضهم للتلوث باستمرار سواء ملوثات غذائية وحتى ملوثات البيئة الاخرى بسبب كثرة الحركة والاختلاط مع الاطفال الاخرين وربما ملامستهم للحيوانات الخازنة والناقلة للطفيلي كذلك المنطقة السكنية المتواجدين فيها خاصة اذا تكثر فيها تربية الحيوانات تعتبر مصدر عدوى بالاضافة الى قلة النظافة والوعي الصحي[10] .

وظهر التباين ايضا في نسب الاصابة باختلاف الجنس في الاطفال فقد كانت اصابة الذكور بنسبة (72.09%) والاناث (30.23%)، اكدت العديد من الدراسات كدراسة [11] ، ان ليس هنالك علاقة مابين الجنس ونسبة الاصابة بطفيل البويغات الخبيئة انما السبب ربما يعود الى نوع الغذاء, او تناول الذكور للاطعمة المكشوفة والملوثة باكياس البيض في الاماكن العامة بسبب كونهم على اتصال مع ظروف البيئة الخارجية التي تلعب دور في انتقال الطفيلي والاصابة به وايضا التدخين بالاراكيل وقلة الاهتمام بالنظافة الشخصية جميعها تزيد من فرصة الاصابة بداء البويغات الخبيئة اكثر من الاناث .

ووجدت اعلى نسبة اصابة بين الاطفال خلال شهر تشرين الثاني وبنسبة (37.2%) وادنى نسبة للاصابة بلغت (2.32%) في شهر شباط 2023 اذ جاءت مطابقة لدراسة [12] التي سجلت اعلى نسبة اصابة في فصل الشتاء والسبب كان الامطار التي تجرف الترب الملوثة باكياس بيض الطفيلي في براز الحيوانات ويختلط مع مصادر المياه مثل الانهار والجداول فينتشر داء البويغات الخبيئة.

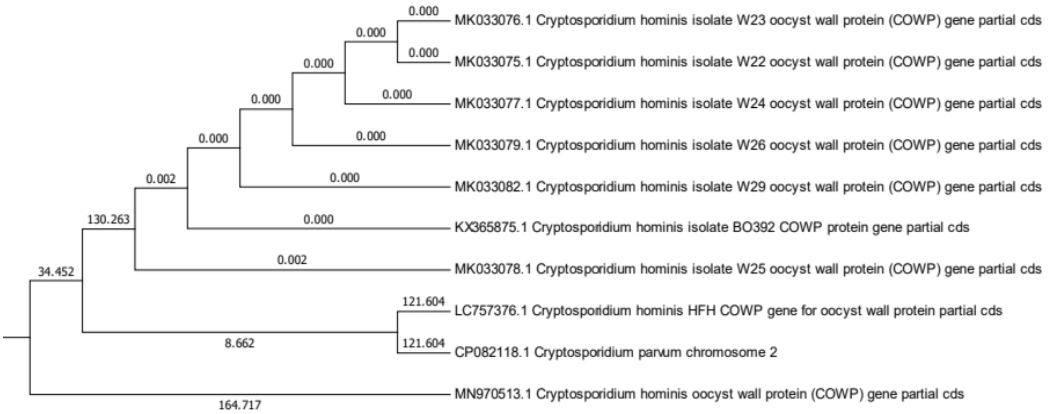
واشارت النتائج ان طفيلي البويغات الخبيئة كان اكثر انتشارا في المناطق الريفية بنسبة (67.44%) واقل في المناطق الحضرية بنسبة (32.55%) وهذا يتفق مع ما وجده كل من [13], [14] ولأسباب عديدة منها تدني مستوى الوعي الصحي والثقافي واستخدام مياه الانهر للشرب والطهي والسباحة وتربية المواشي وملامستها

أظهرت نتائج الفحص الجزيئي عن وجود حزمة واحدة (Single band) في هلام الاكاروز (Agarose gel) ذات وزن جزيئي 650 زوجا من القواعد النتروجينية (Base pairs) في الدنا المستخلص من عينات الغائط للافراد المصابين بداء البويغات الخبيئة وهي تعتبر اشارة على اصابة المريض واظهرت الدراسة الحالية ان الاصابة بطفيلي الابواغ الخبيئة بلغت نسبة (21.92%) اذ كانت متقاربة مع دراسة [16] ,[15] بنسب (24.3%) و (20.8%) و (21.0%) على التوالي الصورة (3).



الصورة (3) حزم الـ DNA للطفيل المعزولة من عينات الغائط

و تم مقارنة العزلات الوراثية مع عزلات اخرى لطفيلي البويغات الخبيئة الشكل (2) من خلال ايجاد الشجرة الوراثية, وقد تم تسجيل نوع جديد من النمط الجيني لطفيلي البويغات الخبيئة في محافظة نينوى وتم تسجيلها في بنك الجينات الوراثي NCBI بأسماء الباحثين اذ تم تحليل تسلسل الحمض النووي لعشرة عينات مختارة من نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل من اصل 25 عينة والتي اظهرت نتيجة موجبة للمنطقة المستهدفة من الحمض النووي للنواتج مع التسلسل الرئيسي للحمض النووي للطفيلي Cryptosporidium reference gene والمنشور في قاعدة بيانات القواعد النتروجينية في موقع GenBank باستخدام BLAST Program of The National Center For Biotechnology Information (NCBI)) اذ كانت نسبة التطابق عالية مع العزلة المسجلة في امريكا في حين كانت نسبة التطابق اقل مع العزلات الاخرى المسجلة و نسبة تطابق تراوحت بين 83-88% وجاءت النتائج تفيد بأن العزلة المحلية والتي تم تسجيلها في بنك الجينات بالتسلسل (757376) وتمتلك نسبة تقارب عالية مع العزلة الامريكية ذات التسلسل (082118) بنسبة تقارب 88% وهذا يدل على اصل نشوء تطوري مرتبط لهذه العزلات على الرغم من تباعد الموقع الجغرافي بين منطقتي عزل الطفيلي للسلالتين المتشابهتين لكن هنالك دراسات اكدت ان السفر والتنقل بين البلدان له دور في تطور العزلات ونقلها من قبل المصابين الى دول عديدة ومختلفة خاصة في الاونة الاخيرة، اذ ذكر [17] ان مرض البويغات الخبيئة اصبح مرض وبائي واطلق عليه اسم اسهال المسافرين Traveller Diarrhea (TD) لانه ينتقل بين المسافرين عن طريق المرافق الصحية العامة في مطارات العالم حيث وجد الطفيلي بهذه الطريقة بنسبة 20-60% في امريكا الشمالية واوربا. ومن الممكن ان يكون سبب ظهور هذه السلالة هو انتقالها اثناء تواجد الجيش الامريكي في الموصل بعد احداث 2003.



الشكل (2) الشجرة التطورية لطفيلي البويغات الخبيئة والعلاقة بين العزلات المحلية والعزلات العالمية)

المصادر:

[1] U. Ryan, A. Paparini, P. Monis, and N. Hijjawi, "It's official–Cryptosporidium is a gregarine: What are the implications for the water industry?," *Water Res*, vol. 105, pp. 305–313, 2016.

[2] T. Cruz-Bustos, A. S. Feix, B. Ruttkowski, and A. Joachim, "Sexual development in non-human parasitic apicomplexa: just biology or targets for control?," *Animals*, vol. 11, no. 10, p. 2891, 2021.

[3] U. N. A. Ryan, R. Fayer, and L. Xiao, "Cryptosporidium species in humans and animals: current understanding and research needs," *Parasitology*, vol. 141, no. 13, pp. 1667–1685, 2014.

[4] R. Fayer, "Taxonomy and species delimitation in Cryptosporidium," *Exp Parasitol*, vol. 124, no. 1, pp. 90–97, 2010.

[5] Z.-D. Wang *et al.*, "Prevalence of Cryptosporidium, microsporidia and Isospora infection in HIV-infected people: a global systematic review and meta-analysis," *Parasit Vectors*, vol. 11, pp. 1–19, 2018.

[6] M. S. Khudhair and N. E. S. Al-Niaeemi, "Experimental study of heat-killed oocysts of Cryptosporidium Parvum in Balb/c Mice," *Journal of Education and Science*, vol. 29, no. 2, pp. 158–173, 2020.

[7] S. A. Henriksen and J. F. L. Pohlenz, "Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique," *Acta Vet Scand*, vol. 22, no. 3–4, p. 594, 1981.

[8] F. Freire-Santos, A. M. Oteiza-Lopez, C. A. Vergara-Castiblanco, and M. E. Ares-Mazas, "Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by Cryptosporidium parvum," *Vet Parasitol*, vol. 87, no. 1, pp. 1–7, 1999.

[9] Z. A. Hussein, "Percentage of infection with Cryptosporidium parvum in children At Al-Zahra Maternity and children Hospital." 2011.

[10] Sh. H. Al-Sultan, "Diagnostic epidemiological and pathological study of Cryptosporidium parvum in children under five years of age in some areas of Nineveh Governorate." 2021.

[11] P. R. Hunter and G. Nichols, "Epidemiology and clinical features of Cryptosporidium infection in immunocompromised patients," *Clin Microbiol Rev*,vol.15,no.1,pp.145-154, 2002.

[12] S. M. A. A.-D. Sabri and others, "Determining the spread of Cryptosporidium by traditional methods in Al-Diwaniyah Governorate-Iraq," *Iraqi Journal of Humanitarian, Social and Scientific Research*, no. وجامعة القاسم ورابطة التدريسيين وتربية -جامعة قم-عدد خاص لوقائع المؤتمر السادس كربلاء, 2022.

[13] M. M. Mohanad, "The study of Cryptosporidium parvum dispersal in children less than five years old in Ramadi province," *J. Al-Anbar Uni. Sci*, vol. 2, no. 2, pp. 84–88, 2008.

[14] W. Al-Kubaisy, H. Al-Talib, A. Al-Khateeb, and M. M. Shanshal, "Intestinal parasitic diarrhea among children in Baghdad-Iraq.," 2014.

[15] K. M. Abdul-Sada, "Molecular and Epidemiological Study of Cryptosporidium spp. in Mid-Euphrates Area," *Kufa Journal for Nursing Sciences*, vol. 5, no. 1, pp. 167–178, 2015.

[16] F. Tahvildar-Biderouni and N. Salehi, "Detection of Cryptosporidium infection by modified ziehl-neelsen and PCR methods in children with diarrheal samples in pediatric hospitals in Tehran," *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, vol. 7, no. 2, p. 125, 2014.

[17] T. Shiota, T. Oda, and N. Arizono, "Imported cryptosporidiosis–report of a case in Japan and review of the literature," *Kansenshogaku Zasshi*, vol. 68, no. 7, pp. 941–945, 1994.