



ISSN: (3007-0384)

E-ISSN: (3007-0392)

مجلة وهج العلوم للعلوم الصرفة

العجلة متاحة على الرابط

<https://uomosul.edu.iq/womeneducation/jwups/>

Hiba Y. Qasim¹
Rana I. Mohammed²
Firas M. Basher³
Biology Department,
College of Education for
Girls, University of Mosul,
Mosul-Iraq,

*Corresponding author e-mail:
hiba.23gep110@student.uomosul.edu.
iq

Keywords:

Cryptosporidium parvum,
Immunodiagnosis of parasite
Cryptosporidium parvum,
Molecular diagnosis of parasite
Cryptosporidium parvum.

ARTICLE INFO**Article history:**

Received: 2024/8/3

Accepted: 2024/9/5

Available online: 2025/1/1

Email:

journal.purescience.ge@uomosul.edu.iq

Immunological and molecular detection of *Cryptosporidium parvum* parasite infection causing diarrhea in some areas of Mosul city.

A B S T R A C T

Fecal samples were collected from 154 children suffering from chronic watery diarrhea from the beginning of July 2023 to the end of December 2023 from Ibn Al-Atheer Teaching Hospital for Children The aim of the study was to immunologically and molecularly detect infection with the *Cryptosporidium parvum* parasite in children under five years of age. in Nineveh Governorate, where 52 (33.76%) samples showed a positive result, while the number of negative samples was (102). through the use of ELISA technology

The Nested polymerase chain reaction method was also used to diagnose the presence of the parasite in the samples. The number of samples examined was 32, with 6 (18.75%) samples out of the total showing a positive result for the presence of the parasite.

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

الكشف المناعي والجزيئي للإصابة بطفيلي الأبواغ الخبيثة

parvum Cryptosporidium المسبب للإسهال في بعض مناطق مدينة الموصل

هبة يونس قاسم الطائي*¹، رنا ابراهيم محمد السبعواوي²، فراس محمد بشير الخشاب³

^(1,2,3) قسم علوم حياة، كلية التربية للبنات، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة

جمعت عينات الغائط من 154 طفل مصاب بالإسهال المائي المزمن من بداية شهر تموز 2023 وإلى نهاية شهر كانون الأول 2023 من مستشفى ابن الأثير التعليمي للأطفال وكان هدف الدراسة هو الكشف المناعي والجزيئي عن الإصابة بطفيل *Cryptosporidium parvum* في الأطفال دون الخمس سنوات من العمر في محافظة نينوى حيث ظهرت نسبة إصابة 33.76% (52) عينة نتيجة موجبة بينما كان عدد العينات السالبة (102) عينة من خلال استخدام تقنية ال ELISA.

واستخدمت أيضاً طريقة Nested polymerase chain reaction في تشخيص وجود الطفيل في العينات وكان عدد العينات المفحوصة 32 حيث أظهرت 18.75% (6) عينات من المجموع الكلي نتيجة موجبة لوجود الطفيلي.

الكلمات المفتاحية: *Cryptosporidium parvum*، التشخيص المناعي لطفيلي *Cryptosporidium parvum*، التشخيص

الجزئي لطفيلي *Cryptosporidium parvum*.

1- التعريف بالبحث:

تعتبر الطفيليات الابتدائية من الأحياء المجهرية حقيقية النواة أحادية الخلية التي لها تأثيرات صحية واقتصادية حيث تعد من اهم المسببات المرضية للحيوان والانسان وتختلف في شدة تأثيرها على المضيف حسب النوع والسلالة وموقع الإصابة [1] ينتمي طفيل *Cryptosporidium* إلى شعبة معقدة القمة Apicomplexa لاحتوائه على تركيب قمي يساعده في اختراق خلية المضيف [2] ويسبب داء البويغات الخبيثة *Cryptosporidiosis* وهو من الأمراض المشتركة بين الحيوان والانسان Zoonotic diseases يغزو السطح القمي للخلايا الظهارية المعوية في تجويف الأمعاء الدقيقة [3] يسبب هذا الطفيل في الأفراد ذوي المناعة القوية الاسهال لفترة زمنية قصيرة، اما الافراد ذوي المناعة الضعيفة والعوز المناعي والرضع في البلدان النامية والعالم الثالث فان الاسهال يستمر معهم لفترة طويلة مشكلاً خطراً على حياتهم [4] كما يعد طفيل الابواغ الخبيثة *Cryptosporidium* مسؤولاً عن الاسهال الشديد وتأخر النمو وضعف الوظائف الإدراكية لدى صغار السن والأفراد قليلي المناعة، ويرتبط أيضاً بقوة بسرطان القولون [5][6] كما ويعتبر السبب في حوالي 30 - 50 % من وفيات داء الابواغ الخبيثة *Cryptosporidiosis* والتي تحدث عند الرضع والاطفال في جميع انحاء العالم. وهو السبب الرئيسي بعد الفايروس الدوار للإصابة بالإسهال والوفاة بين الاطفال [7].

ينتقل الطفيل إلى المضيف النهائي دون الحاجة إلى مضيف وسطي وذلك بطريقتين، مباشرة من خلال التماس المباشر مع الاشخاص أو الحيوانات المصابة، وذلك بانتقال اكياس البيض إلى الفرد السليم [8]، أو غير مباشرة عن طريق تناول اكياس البيض الملوثة للماء والطعام، كما أن وجود اكياس البيض في المياه يعد خطراً كبيراً على الصحة العامة، وهذا بدوره يؤدي إلى انتشار أوبئة في مساحة واسعة من العالم وان طفيل *Cryptosporidium* احد ابرز المسببات للأمراض التي تنتقل عن طريق المياه عالمياً [9]، كما تعد اكياس بيض طفيل *Cryptosporidium parvum* الملوثة للمياه والغذاء ذات مقاومة كبيرة لمعظم المطهرات الكيميائية بالإضافة الى مقاومتها لمعالجات المياه الشائعة الاستخدام مثل الكلور، ومن الصعب القضاء عليها بهذه الطرق، كما ان صغر حجمها يجعل من الصعوبة ازلتها بواسطة انظمة الترشيح النموذجية [10] [11] تم تحديد أكثر من 44 نوع من طفيل *Cryptosporidium* وأكثر من 120 نمطاً وراثياً، ويعتبر النوعان *Cryptosporidium parvum* و *Cryptosporidium hominis* من اهم الانواع التي تصيب الانسان [12].

2- طرق العمل

2-1 جمع ومعاملة عينات الغائط:

جمعت عينات الغائط من الاطفال دون سن الخامسة من العمر المصابين بالإسهال ذكوراً (84) وإناثاً (70)

المراجعين لمستشفى ابن الاثير التعليمي للأطفال في مركز محافظة نينوى للفترة من بداية شهر تموز الى نهاية شهر كانون الاول 2023 بعد استحصال موافقة ولي امر كل المريض من اجل اجراء الفحوصات الخاصة بالكشف عن طفيل *Cryptosporidium*، تم جمع (154) عينة بحجم يتراوح بين 10-15 غم، وتم وضعها في علب بلاستيكية معقمة محكمة الاغلاق للحفاظ على العينات رطبة ومنع جفافها مع تثبيت اسم المريض وعمره وجنسه عليها، ثم تم نقلها الى مختبر البحوث والدراسات العليا في كلية التربية للبنات (جامعة الموصل) مع اعتماد استمارة خاصة بجمع بعض المعلومات عن الاطفال المرضى من حيث السكن والجنس والعمر .

2-2 الفحص المناعي Immunological Examination

اجري الفحص باستخدام تقنية الاليزا ELISA التي تعتمد على طلي الحفر بأجسام مضادة نوعية للطفيلي *Cryptosporidium* في الحفر Wells على (154) عينة من الغائط وعند اضافة العينة التي تحتوي على Antigen الطفيل ترتبط معها بعد ذلك تغسل لإزالة كافة المواد غير المرتبطة بعدها يضاف المحلول المقترن بالأنزيم HRP - Conjugate reagent والذي يرتبط بدوره مع المستضدات المرتبطة مع الاضداد بعدها تغسل لإزالة كافة المواد غير المرتبطة بعدها نضيف محلول المادة الأساس للأنزيم Tetra methyl benzidine (TMB) الذي يتحول الى اللون الازرق بوجود أنزيم kit اليز Catalase بعدها يضاف محلول حامض الكبريتيك لإيقاف التفاعل ويقاس التغير في اللون عند الطول الموجي 450 نانومتر بعدها يقارن مع قيمة الحد الفاصل GUTOFF وأجريت طريقة العمل حسب التعليمات الموجودة في kit والمعتمدة من قبل الشركة المصنعة (IDEAL) الصينية من خلال النشرة المرفقة مع kit .

2-3 طريقة التطويق بالمحلول السكري المشبع

طريقة العمل:

- 1- مزج (1) مل من الغائط مع (9) مل ماء مقطر ورشح المزيج بواسطة 4 طبقات من الشاش الطبي.
- 2- وضع الراشح في أنبوبة اختبار خاصة Test tube وتم وضعها في جهاز الطرد المركزي 1000 Centrifuge دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق.
- 3- سحب 20 % من الجزء الطافي واضيف 10 مل من المحلول السكري إلى الراسب ومزج بشكل جيد.
- 4- نقل انبوبة الاختبار إلى جهاز الطرد المركزي 500 دورة / 15 دقيقة.
- 5- سحب 20 % من الجزء الطافي من العينة ووضعه في انبوبة اختبار جديدة واضيف له (1) مل من محلول (PBS) phosphate buffer saline لكل (1) مل من العينة لمنع تأثير السكر على اكياس البيض .

- 6- بعدها نقلت انبوبة الاختبار الى جهاز الطرد المركزي 1000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق.
- 7- اهمل 30% من الجزء الطافي والاحتفاظ بالراسب.
- 8- اضافة (1) مل من هايوكلورات الصوديوم لكل (1) مل من العينة بتركيز 1% وذلك لقصر العينة Bleaching والتخلص من البكتريا والخمائر وتنقية العينة من الشوائب.
- 9- تم وضع انبوبة الاختبار في جهاز الطرد المركزي 700 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق.
- 10- سكب 30 % من الجزء الطافي واضيف 1مل من محلول PBS لكل 1مل من العينة (الراسب) للتخلص من الكلور بعدها نقلت الانبوبة إلى جهاز الطرد المركزي 700 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق وهذا ما يسمى بالغسل والترسيب.
- 11- تم اخذ جزء من الراسب بواسطة سلك معدني 100P ووضعت على الشريحة الزجاجية وتم صبغها بواسطة MZN وفحصت تحت المجهر للتأكد من وجود اكياس البيض للطفيل.
- 12- أخذ الراسب واضيف له المادة الحافظة ثنائي كرومات البوتاسيوم بتركيز 2.5 % وبمقدار 1مل لكل 1مل من الراسب وحفظت في المجمدة بدرجة التجميد لحين الاستخدام في تقنية Npcr [13-14].

4-2 الفحص الجزيئي Molecular Examination

2-4-1 استخلاص الحامض النووي DNA من عينات الغائط

- 1- اضيف 200 مايكروليتر من العينة الى انابيب bead tube ووضعت في الثلجة.
- 2- اضيف 300 مايكروليتر من SDE1 Buffer و 20 مايكروليتر من محلول Proteinase K الى العينة ومزجت بواسطة جهاز المازج الدوار vortex لمدة 5 دقائق.
- 3- بعدها حضنت الانابيب عند 60 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة بالحمام المائي ووضعت الانابيب في جهاز المازج الدوار كل 5 دقائق خلال فترة التحضين .
- 4- اضيف 100 مايكروليتر من محلول SDE2 Buffer ومزجت في جهاز المازج الدوار وحضنت الانابيب في الثلجة لمدة 5 دقائق.
- 5- وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 130000 / دورة لمدة 5 دقائق.
- 6- نقل الراشح Supernatant بعناية الى انابيب micro centrifuge tube سعة 1.5 مل.
- 7- اضيق 200 مايكروليتر من SDE3 Buffer ومزجت في المازج الدوار وحضنت الانابيب في درجة حرارة الغرفة لمدة 2 دقيقة.
- 8- وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 2 دقيقة.
- 9- نقل 250 مايكروليتر من الراشح إلى انابيب micro centrifuge tube سعة 1.5 مل.
- 10- اضيف 250 مايكروليتر من SDE4 Buffer و 250 مايكروليتر من الايثانول بتركيز (100%)

- 96) ثم مزجت في المازج الدوار.
- 11- جهزت انابيب العمود SDE Column الحاوية على فلتر وتم وضعها في انابيب صغيرة micro centrifuge tube وتم نقل كل العينة إلى SDE Colum.
- 12- وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 13000 / دورة لمدة دقيقة واحدة ثم بعدها نقلت الى SDE Column الى انابيب جديدة.
- 13- اضيف 750 مايكروليتر من محلول الغسل Wash Buffer الى SDE Column وتم وضعها بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 / دورة لمدة دقيقة واحدة بعدها اخذت SDE Column ووضعت في انابيب جديدة.
- 14- قمنا بإعادة الخطوة السابقة.
- 15- جفف عمود SDE Column عند 13000 / دورة لمدة 3 دقائق في جهاز الطرد المركزي.
- 16- اضيف 200 مايكروليتر من محلول الشطف Elution او dd H₂O إلى العمود SDE Column وترك لمدة 2 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.
- 17- ثم وضع بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة عند السرعة 13000 / دورة.
- 18- حفظ الحامض النووي المستخلص بدرجة (20) درجة مئوية لحين اجراء الفحص الجزيئي.
- 19- وقد تم قياس نقاوة الحامض النووي DNA بجهاز Nanodrop.

2-4-2 تفاعل البلمرة المتسلسل Nested PCR

تم تضخيم جزء معين من جين 18SrRNA لطيفيل الابواغ الخبيثة من خلال استخدام بادئات متخصصة (Specific primers) كما موضح في الجدول (1) والتي جهزت من قبل شركة (Macrogen) اذ ثبت حجم التفاعل الرئيس 25 مايكروليتر من خلاله حضر مزيج التفاعل الرئيسي Master, mix reaction لتفاعل الـ PCR ومزجت عينات الدنا والبادئ الخاص لجين الطيفيل مع مزيج التفاعل الرئيسي في انابيب ابندروف ذات الحجم 0.2 مل وضع المزيج في جهاز الطرد المركزي الدقيق لمدة 3 دقائق، ثم ادخلت انابيب التفاعل في جهاز المدوار الحراري Thermocycler لغرض إجراء عملية التضخيم وبعدها الترحيل الكهربائي لنواتج عملية تفاعل البلمرة المتسلسل [15].

2-4-3 تحضير مزيج التفاعل الرئيسي Master mix preparation

تم اجراء تفاعل البلمرة المتسلسل PCR من النوع Nested PCR والمكون من جزئين من التفاعل، حيث تم تحضير المزيج الرئيسي Master mix لتفاعل البلمرة المتسلسل PCR الأول باستخدام عدة مزيج التفاعل الرئيسي لشركة Addbio, Korea، وذلك بحسب الاحجام اللازمة لمكونات التفاعل لكل عينة كما هو موضح في الجدول (2). حيث تم مزج المواد المضافة بشكل جيد ووزعت بحجم 23 مايكروليتر

على الأنابيب الصغيرة PCR tube حجم 0.2 ml خاصة بإجراء تفاعل البلمرة المتسلسل بعد ذلك تم إضافة DNA المستخلص من العينات بحجم (2) مايكرو لتر وبشكل منفصل في الأنبوب الخاص بكل عينة ليصبح الحجم الكلي في كل أنبوبة 25 مايكرو لتر . كما تم إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للبادئ الثاني وذلك باتباع نفس الخطوات السابقة الذكر انفاً وبنفس ظروف التفاعل للبادئ الأول ماعداً إضافة الناتج PCR Product من تفاعل البلمرة المتسلسل الأول First PCR كقالب template لتفاعل البلمرة المتسلسل الثاني Second PCR وكما هو موضح في الجدول (3) (التعليمات الموجودة مع عدة العمل Master mix)

الجدول (1) الابدانات المستخدمة للكشف عن جين 18SrRNA للطفيل

ت	البادئ	Primer 5 sequence 5-3	الطول	حجم الناتج (bp)
1	Crypto-F1	TTCTAGAGCTAATACATGCG	20	1325
2	Crypto-R1	CCCATTTCTTCGAAACAGGA	21	
3	Crypto-F2	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	26	830
4	Crypto-R2	CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA	22	

الجدول (2) مكونات مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل الأولي

الحجم (ml)	المكونات
12.5	محلول المزيج الرئيسي 2X Master Mix
1	البادئ الامامي Crypt-F1 10 pmol/M1
1	البادئ الراجع Crypt-R1 10 pmol/M1
8.5	ماء مقطر خال من الانزيمات PCA grade water
2	الدنا المستخلص من العينة (DNA template)
25	الحجم النهائي

الجدول (3) مكونات المزيج الرئيسي لتفاعل البلمرة المتسلسل الثاني

الحجم (ml)	المكونات
12.5	محلول المزيج الرئيسي 2X Master Mix
1	البادئ الامامي Crypt-F2 10 pmol/M1
1	البادئ الراجع Crypt-R2 10 pmol/M1
10	ماء مقطر خال من الانزيمات PCA grade water
0.5	الناتج من التفاعل الأول PCR Product
25	الحجم النهائي

بعدها تم إدخال أنابيب التفاعل في جهاز المبلر الحراري في جهاز Ti TM Thermocycler (Bio-Rad, USA) Thermal Cycler واستخدام البرنامج الخاص بتفاعل البلمرة المتسلسل [16] وكما موضح بالجدول (4) وبعدها رفعت الانابيب من الجهاز ووضعت في الثلجة 4-8 درجة مئوية لحين إجراء الترحيل الكهربائي للكشف عن نواتج عملية تضخيم الحامض النووي DNA.

الجدول (4) خطوات عمل برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل (ظروف التفاعل)

الخطوة	درجة الحرارة م°	الوقت	عدد الدورات
المسخ الاولي Primary denaturation	94	3 دقائق	1
المسخ Denaturation	94	45 ثانية	35X
ارتباط البادئ Annealing	55	45 ثانية	
استطالة البادئات Extension	72	1 دقيقة	
الاستطالة النهائية Final extension	72	7 دقائق	1
التبريد Cooling	4	∞	-

3- النتائج والمناقشة:

3-1 تشخيص الإصابة بطفيل الابواغ الخبيثة باستخدام تقنية الاليزا:

اظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة الاصابة باستخدام تقنية ELISA لعينات الغائط كانت 33.76% (52) من اصل (154) عينة غائط كما هو موضح في الجدول رقم (5) حيث كانت نسبة الاصابة مرتفعة مقارنة بالعديد من الدراسات منها دراسة [17] في مدينة دهوك اذ بلغت نسبة الاصابة 24.59% من اصل 122 عينة غائط كذلك دراسة [18] في مستشفى الفيوم العام في مصر اذ بلغت نسبة الاصابة لعينات الغائط بتقنية ELISA 21.05% من اصل 152 عينة، بينما هناك دراسات اخرى اشارت الى انخفاض نسبة الاصابة لعينات الغائط باستخدام تقنية ELISA منها دراسة [19] في مدينة الرمادي اذ تم جمع 813 عينة غائط للاطفال دون سن الخامسة وكانت نسبة الاصابة بتقنية ELISA 11.56%، كذلك دراسة [18] في مدينة بني سويف في مصر اذ بلغت الاصابة بطفيل الابواغ الخبيثة 12.5%.

ان هذا الاختلاف في نتائج الفحص المناعي بتقنية ELISA والذي تم ملاحظته في الدراسات اعلاه ربما يعود إلى عدة اسباب منها عدد العينات المفحوصة، ونوع kit المستخدم في تقنية ELISA (ELISA Kit)، حجم العينة، عدد اكياس البيض الموجودة في العينة، كفاءة ودقة الشخص الفاحص.

الجدول (5) نتائج الفحص المناعي

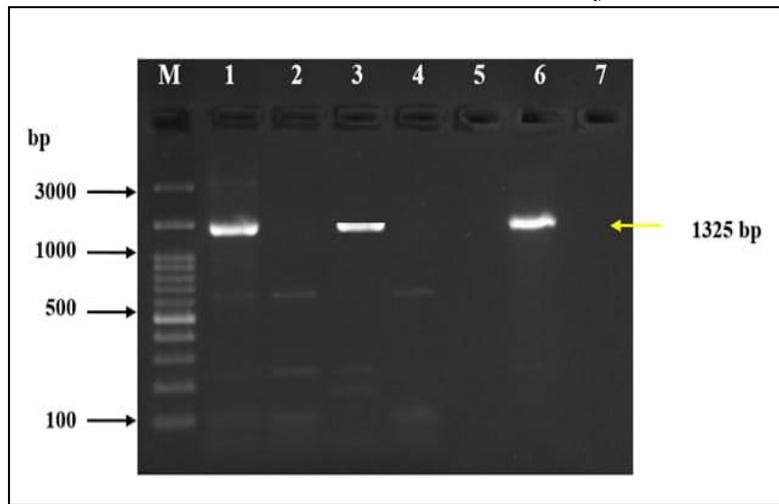
النسبة المئوية	عدد العينات الموجبة	عدد العينات المفحوصة	الفحوصات المختبرية
33.76 %	52	154	الفحص المناعي

3-2 تشخيص الإصابة بطفيل الابواغ الخبيثة باستخدام تقنية nPCR:

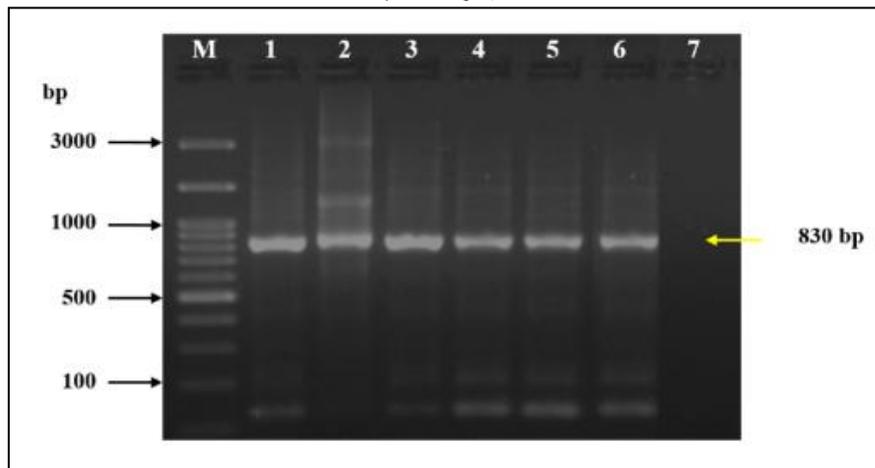
نتائج استخلاص الـ DNA

على الرغم من الصعوبات التي واجهتنا عند اجراء تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل نتيجة استخلاص المادة الوراثية من اكياس بيض الطفيل المعزولة من عينات الغائط لكن تم انجاز العمل بدقة متناهية وكان السبب في هذه الصعوبات هو احتواء الغائط على مثبطات تفاعل PCR قد تبقى موجودة في العينة حتى بعد استخلاص DNA او لقلة اعداد الطفيل في بعض العينات الأمر الذي ادى بدوره إلى قلة المادة الوراثية المستخلصة وقد كانت قراءات DNA الاكاروز لعينات جهاز Nano drop تتراوح بين 0.676-0.782-0.826 ng/μl (المنخفضة فقط) أما بقية العينات تتراوح بين (181.3-246.2 ng/μl).

تم الاعتماد على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل nPCR من اجل الحصول على نتائج الفحص الجزئي اذ تم تضخيم الحامض النووي ال DNA من خلال استخدام زوجين من البادئات المتخصصة لجين 18SrRNA كما تم توضيحه في الجدول (1)، اظهرت النتائج في التضخيم الأول Primary PCR عن وجود حزمة واحدة في هلام الاكاروز ذات وزن جزيئي 1325 زوجاً من القواعد النتروجينية في ال DNA المستخلص من اكياس بيض طفيل الابواغ الخبيثة والتي تم عزلها بطريقة التطويق بالمحلول السكري وهذا يدل على الاصابة بالطفيل، بينما في التضخيم الثاني Second PCR فقد بينت النتائج وجود حزمة واحدة في هلام الأكاروز ذات وزن جزيئي 830 زوجاً من القواعد النتروجينية وهذا يدل على إصابة المريض بالطفيل. تبين من خلال نتائج دراستنا الحالية أن التضخيم الثاني Second PCR هو اكثر دقة من التضخيم الأول Primary PCR اذ ظهرت في التضخيم الاول(3) عينات موجبة من أصل(32) عينة كما في الشكل(1)، بينما في التضخيم الثاني فقد ظهرت(6) عينات موجبة من اصل(32) كما في الشكل(2).



الشكل (1) يمثل الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل الاولي PRIMERY PCR للكشف عن جين 18S rRNA gene external fragments الخاص بالكشف عن *Cryptosporidium spp. M.* المؤشر Marker حجم 100 bp. الحفر 1 و 3 و 6 تمثل عينات موجبة وبحجم ناتج 1325 bp الحفرة 7 تمثل السيطرة السالبة.



الشكل (2) يمثل الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل الثاني SECOND PCR تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للكشف عن جين 18S rRNA gene internal fragments الخاص بالكشف عن *Cryptosporidium spp. M.* المؤشر Marker حجم 100 bp. الحفر من 1 إلى 6 تمثل عينات موجبة وبحجم ناتج 830bp الحفرة 7 تمثل السيطرة السالبة.

كما تبين انه من خلال استخدام تقنية nPCR تزداد فرص الكشف عن التراكيز القليلة من المادة الوراثية الـ DNA بسبب قلة عدد اكياس البيض في العينة , وقد بينت الدراسة الحالية ان نسبة الاصابة بطفيل الابواغ الخبيثة بلغت 18.75% وكما تم توضيحها في الجدول (5)

كانت نتائج الدراسة الحالية متقاربة مع دراسة [21] في محافظة المثنى اذ بلغت نسبة الاصابة 18% كذلك دراسة [20] في مصر اذ بلغت نسبة الاصابة 21.0% , ايضاً دراسة [22] في قطر حيث بلغت نسبة الاصابة 17.5% , كذلك دراسة [23] في نيجيريا اذ بلغت نسبة الاصابة 17.6% .

اما النسب المرتفعة فقد سجلت في دراسة [24] في محافظة بابل اذ بلغت نسبة الاصابة بطفيل الابواغ الخبيثة 92% , كذلك دراسة [25] بنسبة 82% , كذلك دراسة [26] بنسبة 74.5% , ودراسة [27] في مدينة الكوت 39.6% , ايضاً دراسة [15] في مصر حيث بلغت نسبة الاصابة بتقنية nPCR 59% , ايضاً دراسة [28] اذ بلغت نسبة الاصابة 85.2% .

ان سبب هذا الاختلاف في النسب المئوية للإصابة بالطفيل بالفحص الجزيئي الذي تم ملاحظته في الدراسات اعلاه ربما يعود إلى عدة اسباب منها عدد العينات المفحوصة، نوع الجين المستهدف وطريقة وكفاءة التقنية المستخدمة في استخلاص الـ [DNA 29] او ربما يعود السبب إلى نوع Kit المستخدم في عملية استخلاص الحامض النووي الـ DNA وكفاءة عملية الاستخلاص وعدد اكياس البيض الموجودة في العينة ودقة الشخص الفاحص، وطريقة حفظ العينات.

يعد التشخيص الجزيئي لطفيل الابواغ الخبيثة باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل احد اهم اهداف الدراسة الحالية حيث تتميز الطرق الجزيئية بالسهولة والسرعة اضافة إلى أنه يمكن من خلالها تشخيص الطفيل بشكل موثوق به وتحديد مصدر الاصابة به بالاضافة الى تحديد عوامل ضراوته [30].

تصل حساسية تقنية PCR إلى القدرة على تحديد 20 كيس بيض في (1) مل من العينة [31]، بينما تصل حساسية تقنية nPCR (4-5) مرات اكثر من تقنية PCR البسيط [32]، يستخدم التحليل الجزيئي ايضاً لوصف او معرفة التركيب الوراثي لانواع طفيل *Cryptosporidium* ، وقد تم اثبات ان الطرق الجزيئية تمتلك حساسية عالية ولها القدرة على تحديد انواع الطفيل [33] اضافة الى ذلك لقد ثبت ان استخدام جين 18SrRNA في تقنية nPCR يعطي نتائج افضل واكثر دقة من تفاعل البوليميريز المتسلسل الاولي في تشخيص انواع طفيل *Cryptosporidium* [34].

أذ يتم استخدام تحليل الوحدة الفرعية الصغيرة لجين 18SrRNA للكشف عن الحامض النووي للطفيل وتحديد الانواع والانماط الجينية في العينات البشرية والحيوانية والبيئية [35] وتقدر حساسية فحص nPCR 100% مقارنة مع الفحص المجهرى, كذلك يمكن من خلال تقنية nPCR الكشف عن الحالات السالبة في كل من الفحص المجهرى و Primary PCR [36].

4- الاستنتاجات

- 1- أعلى نسبة إصابة ظهرت في التشخيص المناعي لعينات الغائط بطريقة الأليزا اذ بلغت نسبة الإصابة 33.76 % لذلك فهي تعتبر من أفضل الطرق لتشخيص الطفيلي.
- 2- أن التضخيم الثاني Second PCR هو أكثر دقة من التضخيم الأول Primary PCR إذ ظهرت في التضخيم الاول (3) عينات موجبة من اصل (32) عينة بينما في التضخيم الثاني فقد ظهرت (6) عينات موجبة من أصل (32) عينة

المصادر:

- [1] M. Florin-Christensen, L. Schnittger, R. G. Bastos, and C. E. Suarez, "Pursuing effective vaccines against cattle diseases caused by apicomplexan protozoa," CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, vol. 16, no. 24, 2021.
- [2] E. Gerace, V. D. M. L. Presti, and C. Biondo, "Cryptosporidium infection: Epidemiology, pathogenesis, and differential diagnosis," European Journal of Microbiology and Immunology, vol. 9, no. 4, pp. 119-123, 2019.
- [3] K. L. VanDussen, L. J. Funkhouser-Jones, M. E. Akey, D. A. Schaefer, K. Ackman, M. W. Riggs, and L. D. Sibley, "Neonatal mouse gut metabolites influence Cryptosporidium parvum infection in intestinal epithelial cells," MBio, vol. 11, no. 6, pp. 10-1128, 2020.
- [4] خضير, محمد صالح و صالح, نبيل عناد (2020) دراسة تجريبية لأكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة *Cryptosporidium parvum* المقتولة بالحرارة في الفئران البيض, مجلة التربية والعلم, المجلد 29 العدد 2.
- [5] M. Santin, "Cryptosporidium and Giardia in ruminants," Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, vol. 36, no. 1, pp. 223-238, 2020.
- [6] D. J. Pinto and S. Vinayak, "Cryptosporidium: host-parasite interactions and pathogenesis," Current Clinical Microbiology Reports, vol. 8, pp. 62-67, 2021.
- [7] A. N. Tombang, N. F. Ambe, T. P. Bobga, C. N. Nkfusai, N. M. Collins, S. B. Ngwa, and S. N. Cumber, "Prevalence and risk factors associated with cryptosporidiosis among children within the ages 0–5 years attending the Limbe regional hospital, southwest region, Cameroon," BMC Public Health, vol. 19, pp. 1-10, 2019.
- [8] J. E. Dumain, J. Tandel, and B. Striepen, "Cryptosporidium parvum," Trends in Parasitology, vol. 36, no. 5, pp. 485-486, 2020.
- [9] N. Li, N. F. Neumann, N. Ruecker, K. A. Alderisio, G. D. Sturbaum, E. N. Villegas, and L. Xiao, "Development and evaluation of three real-time PCR assays for genotyping and source tracking *Cryptosporidium* spp. in water," Applied and Environmental Microbiology, vol.81, no.17, pp.5845-5854, 2015.
- [10] F. S. Cunha, R. H. S. Peralta, and J. M. Peralta, "New insights into the detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* with emphasis in Brazilian studies: a review," Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, vol. 61, pp. e28, 2019.

- [11] A. Dominguez-Uscanga, D. F. Aycart, K. Li, W. H. Witola, and J. E. A. Andrade Laborde, "Anti-protozoal activity of Thymol and a Thymol ester against *Cryptosporidium parvum* in cell culture," *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, vol. 15, pp. 126-133, February 2021.
- [12] U. M. Ryan, Y. Feng, R. Fayer, and L. Xiao, "Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia*—a 50-year perspective (1971–2021)," *International Journal for Parasitology*, vol.51, nos.13-14, pp.1099-1119, 2021.
- [13] M. Khudhair, & N. Al-Niaeemi, "Experimental study of heat-killed oocysts of *Cryptosporidium Parvum* in Balb/ c Mice" *Journal of Education and Science*, 29(2), 158–173, 2020.
- [14] F. Feire-Santos, A.M. Oteiza-Lopes, C.A. Vergara-Castiblanco, M.E. Area-Mazas "Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*", *Vet. Parasitol.* vol 87: 1-7, 1999.
- [15] A. M. Elsayey, S. H. Elgendy, S. A. Abdel-Magied, Y. Mosaad, and N. Nabih, "Prevalence of *Cryptosporidium* species among immunocompetent and immunocompromised Egyptian children: comparative study," *Parasitologists United Journal*, vol. 13, no. 2, pp. 114-120, 2020.
- [16] K. Ghanadi, A. K. Khalaf, A. Jafrasteh, K. Anbari, and H. Mahmoudvand, "High prevalence of *Cryptosporidium* infection in Iranian patients suffering from colorectal cancer," *Parasite Epidemiology and Control*, vol.19, pp.e00271, 2022.
- [17] A. T. Al-Saeed, J. M. Abdo, and R. G. Gorgess, "Cryptosporidiosis in Children in Duhok City/Kurdistan Region/Iraq," *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, vol. 70, no. 7, pp. 1251-1255, 2020.
- [18] F. A. M. Mohamed and M. Masoud, "Cryptosporidiosis among outpatients with diarrhea in El Fayoum General Hospital Egypt: diagnosis and risks," *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, vol. 53, no. 1, pp. 57-62, 2023.
- [19] K. K. Al-Dulaimi, "The prevalence of the *Cryptosporidium parvum* among children in Ramadi city", *Tikrit Journal of Pure Science*, vol.27, no.3, pp.1-5, 2022.
- [20] S. S. A. Gawad, M. A. Ismail, N. F. Imam, and A. H. Eassa, "Detection of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic immunocompetent patients in Beni-Suef, Egypt: insight into epidemiology and diagnosis," *The Korean Journal of Parasitology*, vol. 56, no. 2, pp. 113, 2018.
- [21] N. R. Jomah and M. O. Mallah, "Comparison study of real-time PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in diarrheic children in AL-Muthanna Province–Iraq," *MJPS*, vol. 3, no. 1, 2016.
- [22] S. Sabooni, H. Salah, R. Singh, K. Al-Qadi, S. J. Taj-Aldeen, and E. Ibrahim, "Occurrence of *Cryptosporidium* in human stool samples in Qatar," 2023.
- [23] B. O. Olopade, O. B. Ekuntuyi, B. W. Odetoyn, and A. O. Onipede, "Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in under-five children with diarrhea in Ile-Ife, Nigeria," *International Journal of Tropical Disease & Health*, vol. 44, no. 19, pp. 30-39, 2023.
- [24] F. H. Abbas, "Molecular detection of *Cryptosporidium* spp. from human in Iraq," *Central Asian Journal of Medical and Natural Science*, vol. 4, no. 5, pp. 682-692, 2023.

- [25] M. A. Eraky, A. M.-S. El-Hamshary, H. H. Hamadto, K. F. Abdallah, W. M. Abdel-Hafed, and S. Abdel-Had, "Predominance of *Cryptosporidium parvum* genotype among diarrheic children from Egypt as an indicator for zoonotic transmission," *Acta Parasitologica*, vol. 60, no. 1, pp. 26-34, 2014.
- [26] Gh. Th. Al-Hadidi, "Microscopic and molecular detection to identify the common species of *Cryptosporidium* spp. in the samples of diarrhea in Al Kut city," 2021.
- [27] M. N. Alkhanaq and G. T. Al-Hadidi, "Molecular study of *Cryptosporidium* spp. among diarrheal patients at Wasit province, Iraq," *AsPac J Mol Biol Biotechnol*, vol. 30, pp. 24-31, 2022.
- [28] S. M. Mohammad, M. S. Ali, S. A. Abdel-Rahman, R. A. Moustafa, and M. H. Sarhan, "Genotyping of *Cryptosporidium* species in children suffering from diarrhea in Sharkyia Governorate, Egypt," *The Journal of Infection in Developing Countries*, vol. 15, no. 10, pp. 1539-1546, 2021.
- [29] العبيدي, هبة قاسم محمد خلف (2023) التشخيص المجهرى والجزئى لطفيلي البوغيات الخبيثة *Cryptosporidium* spp لدى الأطفال الذين يعانون من الأسهال رسالة ماجستير, كلية التربية للبنات جامعة الموصل العراق, كلية التربية للبنات، جامعة الموصل، العراق، 2023.
- [30] T. J. R. Trisha, E. A. Charlott, and K. E. Smith, "Evaluation of the positive predictive value of rapid assays used by clinical laboratories in Minnesota for the diagnosis of *Cryptosporidiosis*," *Oxf. J.*, vol. 50, no. 1, 2012.
- [31] H. V. Smith, S. M. Caccio, N. Cook, R. A. B. Nichols, and A. Tait, "*Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses," *Veterinary Parasitology*, vol. 149, nos. 1-2, pp. 29-40, 2007.
- [32] S. Kato, G. Lindergard, and H. O. Mohammed, "Utility of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene in a nested PCR approach for detection infection in cattle," *Veterinary Parasitology*, vol. 111, nos. 2-3, pp. 153-159, 2003.
- [33] L. Xiao, "Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update," *Experimental Parasitology*, vol. 124, no. 1, pp. 80-89, 2010.
- [34] N. J. Ruecker, R. M. Hoffman, R. M. Chalmers, and N. F. Neumann, "Detection and resolution of *Cryptosporidium* species and species mixtures by genus-specific nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, direct sequencing, and cloning," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 12, pp. 3998-4007, 2011.
- [35] A. E. Köseoğlu, H. Can, M. Karakavuk, M. Güvendi, A. D. Döşkaya, P. B. Manyatsi, and C. Ün, "Molecular prevalence and subtyping of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples collected from stray cats in İzmir, Turkey," *BMC Veterinary Research*, vol. 18, no. 1, pp. 89, 2022.
- [36] A. B. Kuzehkanan, M. Rezaeian, H. Zeraati, M. Mohebal, A. R. Meamar, Z. Babaei, and S. Rezaie, "A sensitive and specific PCR based method for identification of *Cryptosporidium* Sp. using new primers from 18S ribosomal RNA," *Iranian Journal of Parasitology*, vol. 6, no. 4, pp. 1, 2011.