الجمهورية العربية السورية
جـــامعـــــة حمـــــــاة
كليـــة الطـــب البيطـــري
قســـم الأحيـــــاء الدقيقة

عزل أنواع البوغيات الخفية وتنميطها جينياً باستخدام تقنية تعدد أشكال أطوال الشُذَف المُقتطَعَة

رسالـة أعدت لنيل درجة الدكتوراه باختصاص الطفيليات

إعداد

مرشد عدنان كاسوحة

ماجستير في علم الطفيليات

بإشـــــــــــــراف

أ.د. عبد الكريم الخالد

أستاذ في علم الطفيليات–قسم الأحياء الدقيقة– كلية الطب البيطري

2018م-1439هـ

الجمهورية العربية السورية
جامعة حماة
كلية الطب البيطري

Syrian Arab Republic
Hama Universit
Faculty of Veterinary.-Medicine

هاتف : 2510180 – 2510181 0096333 - فاكس : 00963332510514 - بريد الكتروني : vet-med@net.sy

الرقم :
التاريخ :
التصنيف :
الموضوع :

قرار لجنة الحكم والمناقشة

استناداً إلى قرار مجلس الشؤون العلمية رقم (9) المتخذ بالجلسة رقم (2) للعام الدراسي 2017 – 2018 المنعقدة بتاريخ /13/ محرم1437هـ الموافق 2017/10/3 القاضي بتشكيل لجنة الحكم والمناقشة لرسالة الدكتوراه للطالب مرشد كاسوحة بعنوان :

" عزل أنواع البوغيات الخفية وتنميطها جينياً باستخدام تقنية تعدد أشكال أطوال الشدف المقتطعة"

وبعد عرض الرسالة وسردها ومناقشتها، اجتمعت لجنة الحكم والمناقشة بتاريخ 2017/11/27 وبعد المداولة قررت اللجنة ترشيح طالب الدراسات العليا مرشد كاسوحة لنيل درجة الدكتوراه في العلوم الطبية البيطرية – اختصاص (الطفيليات) بتقدير عام (95.8) وبدرجة(شرف).

وتوصي اللجنة بصرف تكاليف طباعة الأطروحة على نفقة الجامعة نظراً للجهد الذي بذله الطالب والتكاليف التي تكبدها إضافة إلى تناوله موضوعاً حساساً من الناحية الاقتصادية في القطر.

أعضاء اللجنة :

التوقيع

أ.د . عبد الكريم الخالد
اختصاص طفيليات وأمراض طفيلية
كلية الطب البيطري- جامعة حماه

أ. د. محمد محسن قطرنجي
اختصاص علم الطفيليات
كلية الطب البيطري- جامعة حماه

أ.د عبد الكريم قلب اللوز
اختصاص أمراض سارية
كلية الطب البيطري- جامعة حماه

أ.د سامر ابراهيم
اختصاص التشخيص المخبري
كلية الطب البيطري- جامعة حماه

أ.د. محمود قدير
اختصاص مناعة طفيلية
كلية العلوم - جامعة دمشق

الجمهورية العربية السورية
جامعة حماة
كلية الطب البيطري

Syrian Arab Republic
Hama Universit
Faculty of Veterinary.-Medicine

هاتف : 2510180 – 2510181 0096333 - فاكس : 00963332510514 - بريد الكتروني : vet-med@net.sy

الرقم :
التاريخ :
التصنيف :
الموضوع :

الأستاذ الدكتور عميد كلية الطب البيطري

بعد الإطلاع على الأطروحة المعدلة من رسالة الدكتوراه المقدمة من قبل المرشح لنيل درجة الدكتوراه في العلوم الطبية البيطرية الطبيب البيطري طالب الدراسات العليا **مرشد كاسوحة** في قسم الأحياء الدقيقة اختصاص (**الطفيليات**) بعنوان :

" عزل أنواع البوغيات الخفية وتنميطها جينياً باستخدام تقنية تعدد أشكال أطوال الشدف المقتطعة"

نفيدكم بأن الأطروحة بشكلها الحالي قد استوفت التعديلات التي أشارت لها لجنة الحكم والمناقشة التي عقدت يوم الاثنين بتاريخ 11/27 / 2017 لمناقشة الرسالة، ونعتبر أن الرسالة بهذه الصورة جاهزة للطباعة بشكلها النهائي.

2017/ /

يرجى الإطـلاع

وتفضلوا بقبول فائق الاحترام والتقدير

عضو	عضو	عضو	عضو	رئيس اللجنة
أ.د.محمود قويدر	أ.د. سامر ابراهيم	أ.د عبد الكريم قلب اللوز	أ.د محمد محسن قطرنجي	أ.د عبد الكريم الخالد

رئيس القسم

الدكتور محمد محسن قطرنجي

مصدق عميد الكلية

الدكتور محمد فـاضل

إلى من يهمه الأمر

تم التدقيق اللغوي لمخطوط أطروحة الدكتوراه لطالب الدراسات العليا مرشد كاسوحة ، والمسجل في قسم الأحياء الدقيقة في كلية الطب البيطري بجامعة حماة اختصاص \الطفيليات\ وعنوانها:

"عزل أنواع البوغيات الخفية وتنميطها جينياً باستخدام تقنية تعدد أشكال أطوال الشدف المقتطعة"

وقمت بتقويم ما فيها من مآخذ لغوية وإملائية، وأوصيت الطالب أن يأخذ بهذه التقويمات.

11-1-2018

المدقق اللغوي

عدنان كاسوحة

إجازة في اللغة العربية وآدابها- جامعة دمشق

كلمة شكر و امتنان

أتقدم بالشكر الجزيل للأستاذ المشرف الدكتور **عبد الكريم الخالد** لما قدمه من جهد و خبرة علمية ومحبة كان لها الدور الأساس في إتمام و إنجاح هذه الرسالة، كما أتوجه بشكر خاص إلى **د .شادي سكرية** الذي وفّر كل الإمكانيات العلمية وقدم كل ما يلزم لإنجاز هذا العمل، وأقدم كل امتناني إلى **د .محمود قويدر** وجميع طلاب الدراسات العليا والزملاء الذين تعرفت عليهم في مخبر المناعة والبيولوجيا الجزيئية–كلية العلوم –جامعة دمشق والذين قدموا مساعدتهم **(دينا،دانيا، رناد، نور حمودة)**، وأيضاً لابد من شكر من بدأت معه أولى خطوات هذا العمل صديقي الغالي **د .ماهر درويش**، وأيضاً **د .إيلين إبراهيم ود .كرم العوير** اللذين كانا عوناً لي في تأمين عينات الدراسة .

هناك أيضاً أخوة وأساتذه وأصدقاء ساندوني ودعموني منذ بزوغ فكرة هذا البحث والكلمات الأولى فيه وفضلهم كبير ولولاهم لما اكتمل، وأود أن أخص بشكري **د .سامر إبراهيم** الأستاذ والصديق الذي لم يبخل يوماً بجهد أو نصيحة أو علم، **ود .محمد محسن قطربجي** الأخ الأكبر والصديق الدائم الذي نلجأ إليه ونتعلم من خبرته ومشورته، و **د .أسامة الوهيب** الذي يشاركني دائما هموم العمل والحياة، كما أقدم محبتي وامتناني إلى **د . محمد أمين صباغ** على مساندته الدائمة وعلى تقديمه عينة الشاهد الإيجابي التي دعمت نتائج هذا العمل .

كما أشكر المدقق اللغوي لهذه الأطروحة والدي الغالي **أ .عدنان كاسوحة** على جهده الذي قدمه لكي تكون هذه الرسالة بأفضل صورة ممكنة من الناحية اللغوية .

وأخيراً شكري الكبير إلى رئاسة جامعة حماة وجامعة البعث وإلى عمادة وإدارة كلية الطب البيطري التي قدمت كل ما يلزم من تسهيلات و تعاون كان له الأثر البالغ في إنجاز هذا العمل .

تصريح

أصـــــــــــرح بـــــــــــأن هـــــــــــذا البحـــــــــــث والموســـــــــــوم بعنـــــــــــوان
(عزل أنواع البوغيات الخفية وتنميطها جينياً باستخدام تقنية تعدد أشكال أطوال الشُدَف المُقتطـَعة)
لم يسبق أن قبل للحصول على أية شهادة ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

المرشح
مرشد عدنان كاسوحة

التاريخ / / 2018 م

Declaration

It is hereby declared that this work (**Isolation And Genotyping Of *Cryptosporidium* Species By PCR/RFLP Technique**) has not been accepted already for any degree, nor is being submitted concurrently for any other degree.

Candidate
Morshed Adnan Kassouha Date / / 2018

شـــــــــهـادة

نشــهد بــأن العمــل الموصــوف فــي هــذه الرســالة هــو نتيجــة بحــث قــام بــه المرشــح الطالــب **مرشد عدنان كاسوحة** تحت إشراف **الدكتور عبد الكريم الخالد** أستاذ الطفيليات في كلية الطب البيطري في جامعة حماة ، وأي رجوع إلى بحث آخر في هذا الموضوع موثق في النص.

المرشـح
مرشد عدنان كاسوحة

المشرف العلمي
أ.د. عبد الكريم الخالد

التاريخ / / 2018 م

*Certificate *

It is hereby certified that the work described in this thesis is the result of own investigation **Morshed Adnan Kassouha** under supervision of the **Prof.Dr. AbdulKarim AL-Khaled** in Department of Microbiology at Faculty Of Veterinary Medicine. Hama University. And any reference to other researcher work has been acknowledged in the paragraphs .

Candidate
Morshed Kassouha

Prof. Dr.
AbdulKarim AL-Khaled

Date / / 2018

جدول الاختصارات Abbreviations table	
الاختصار	الاسم بالعربي الاسم بالإنكليزية
Ach	الأسيتيل كولين Acetylcholine
ANOVA	تحليل التباين Analysis Of Variation
bp	زوج أساس Base pair
CAM	الغشاء السقائي المشيمائي Chorioallantoic Membrane
cAMP	الأدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي Cyclic adenosine monophosphate
$CD4^+$	اللمفاويات التائية التي تعبر عن المستقبلة CD4 (مجموعة التفريق 4) Lymphocytes which express CD4 receptor
COWP	بروتين جدار البيضة المتكيسة للبوغة الخفية Cryptosporidium oocyst wall protein
CSL	البروتين السكري الشبيه بالبروتين المحيط بالحيوان البوغي Circumsporozoite-Like GP
EIA	المقايسة المناعية الأنزيمية Enzyme Immunoassay
ELISA	المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ETEC	الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان المعوي Enterotoxigenic E.coli
FDA	إدارة الأغذية والأدوية Food and Drug Administration
FITC-C-mAbs	الأضداد وحيدة النسيلة الموسومة بفلورو أيزو ثيوسيانات Monoclonal antibodies conjugated with FITC
GP40	البروتين السكري 40 كيلو دالتون Glycoproteins 40 kilo dalton

خط خلوي من سرطانة القولون البشري Human colon carcinoma cell line	HCT-8
فيروس نقص المناعة البشري Human Immunodeficiency Virus	HIV
بروتين الصدمة الحرارية 70 كيلو دالتون Heat Shock Protein 70 Kilo Dalton	HSP70
الدستور العالمي للتسميات الحيوانية International Code of Zoological Nomenclature	ICZN
الفصل المناعي المغناطيسي Immunomagnetic Separation	IMS
كيلو دالتون Kilo Dalton	KDa
المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية National Center of Biotechnology Information	NCBI
بيضة متكيسة في الغرام Oocyst per Gram	OPG
تفاعل البوليميراز المتسلسل Polymerase chain reaction	PCR
بروستغلاندين I2 ، بروستغلاندين E2 Prostaglandin E_2, Prostaglandin I_2	PGE_2,PGI_2
باهاء (درجة الحموضة) *Potential of hydrogen*	pH
picomole بيكو مول	pmol
تفاعل البوليميراز المتسلسل الأول Primary PCR	P/PCR
تفاعل PCR المضخم للDNA بأشكال متعددة عشوائياً Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction	RAPD-PCR
تعدد أشكال أطوال الشدف المقتطعة Restriction Fragment Length Polymorphism	RFLP
العوز المناعي المشترك الشديد (الوخيم) Severe Combined Immune Deficiency	SCID

سلفات دوديسيل الصوديوم Sodium dodecyl sulfate	SDS
تفاعل البوليميراز المتسلسل الثاني Secondary PCR	S/PCR
الحمض الريبي النووي الريباسي الخاص بالوحيدة الصغرى Small Subunit Ribosomal Ribonucleic Acid	SSU rRNA
عديد الببتيد المعوي الفعال في الأوعية Vasoactive Intestinal Polypeptide	VIP

فهرس المحتويات

المحتويات

جدول الاختصارات III

فهرس المحتويات VI

فهرس الأشكال: VIII

فهرس الجداول: IX

فهرس المخططات: IX

1- المُقدِّمة 2

2- سرد الأبحاث 6

2-1- وصفٌ وتعريف 6

2-2-التصنيف والتصنيف الجزيئي 7

2-3-دورة الحياة والزارعة الخلوية 11

2-4-طيف الاستضافة (الأثوياء) 16

2-5- داء البوغيات الخفية 17

2-5-1- الوبائية وعوامل الخطورة 17

2-5-2- فترة الحضانة والأعراض 19

2-5-2- الآلية الإمراضية والفيزيولوجية المرضية 22

2-6- التشخيص والتنميط الجيني 24

2-6-1- التشخيص المجهري 24

2-6-2-التشخيص المصلي والمناعي 26

2-6-3- الطرائق الجزيئية والتنميط الجيني 27

2-7- الإكثار في حيوانات التجارب وأجنة الدجاج 30

2-8-الوقاية والعلاج 32

2-8-1- الوقاية 32

2-8-2-العلاج 33

2-9-البوغيات الخفية في سورية 35

3-مواد البحث وطرائقه 38

3-1- جمع العينات وفحصها 38

3-1-1- جمع العينات 38

3-1-2- فحص العينات 39

3-2- استخلاص الـDNA وتنميط العينات جينياً 42

3-2-2- تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش 43
3-2-3- تحليل تعدد أشكال أطوال الشدف المقتطعة 45
3-3- تنقية البيوض المتكيّسة للبوغة الخفية الصغيرة ودراسة إخماجيتها لدى بعض حيوانات التجارب 47
3-3-1-عزل البيوض المتكيّسة وتنقيتها جزئياً 47
3-3-2- دراسة إخماجية البوغة الخفية الصغيرة C. parvum عند الهمستر والأرانب وفي أجنَّة الدجاج 47
3-3-3-التحليل الإحصائي 50
4-النتائج 52
4-1- نتائج فحص العينات وتحديد الأنواع 52
4-1-1- نتائج الفحوصات الطفيلية 52
4-1-2- نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشّش وتحليل تعدد أشكال أطوال الشُدَف المقتطعة 59
4-2- دراسة إخماجية البوغة الخفية الصغيرة عند الهمستر السوري والأرانب وفي أجنة الدجاج 65
4-2-1- نتائج تنقية البيوض المتكيسة للبوغة الخفية الصغيرة 65
4-2-2- نتائج إخماجية البوغة الخفية الصغيرة عند الهمستر والأرانب 66
4-2-3- نتائج إخماجية البوغة الخفية الصغيرة في أجنة الدجاج 69
5-المناقشة 72
5-1- نتائج فحص العينات وتحديد الأنواع 72
5-1-2- البوغيات الخفية عند الإنسان 72
5-1-2- البوغيات الخفية عند العجول والأبقار البالغة 74
5-1-3- البوغيات الخفية عند دجاج اللحم 76
5-1-4- مقارنة طريقة الفحص المجهري مع تفاعل البوليميراز المعشش المستخدم في هذه الدراسة 77
5-1-5- الإصابة بالطفيليات الأوالي في العينات المجموعة من الأطفال 78
5-2 - إخماجية البوغة الخفية الصغيرة عند الهمستر السوري والأرانب وفي أجنة الدجاج 79
6-الاستنتاجات والتوصيات 82
6-1- الاستنتاجات 82
6-2- التوصيات 84
7-ملخص باللغة العربية 87
8-المراجع 91
9- ملخص باللغة الإنكليزية :English Abstract 106

فهرس الأشكال:

1-الشكل 2-1 : البيضة المتكيّسة عند البوغيات الخفيّة 6
2-الشكل 2-2: موقع البوغيات الخفية تصنيفياً 7
3-الشكل 2-3 : بنية الحيوان البوغي لدي البوغيات الخفية 11
4-الشكل 2-4:دورة حياة وتطور البوغيات الخفية عند الإنسان والحيوان 13
5-الشكل 2-5: دورة حياة البوغة الخفية الصغيرة C. parvum في المزارع الخالية من الخلايا 15
6-الشكل 2-6: تشكل عضو التغذية في الحالة الخارج خلوية وبوجود الخلايا 16
7-الشكل 2-7: تأثير البروستغلاندينات على الخلية الظهارية المعوية 24
8-الشكل 2-8: توضيح لمبدأ تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش Nested-PCR 29
9-الشكل 3-1: الطبقات المتشكلة في الأنبوب بعد إنجاز طريقة الفورمول – إيتر التركيزية 42
10-الشكل 3-2: العتيدة المستخدمة في استخلاص الـDNA من عينات البراز 43
11-الشكل 3-3: العينة بعد تثفيلها بوجود الإيتر بهدف تنقية البيوض المتكيّسة 48
12-الشكل 3-4: تجريع الهمستر عن طريق الفم 48
13-الشكل 3-5: حقن أجنة بيض الدجاج 50
14-الشكل 4-1: البيوض المتكيّسة للبوغيات الخفية بعد صباغتها بطريقة كينيون (x2000) 52
15-الشكل 4-2: قطيرات دهنية بلون وردي في لطاخة محضرة من عينة بشرية (x2000) 53
16-الشكل 4-3: البيوض المتكيسة للبوغة الخفية في إحدى العينات المجموعة من عجل رضيع بعد صباغتها بملون كينيون (x2000)55
17-الشكل 4-4: البيوض المتكيسة للبوغة الخفية في إحدى العينات المجموعة من عجل رضيع من دون صباغة (x800)..... 55
18-الشكل 4-5: الخلايا الخمائرية في لطاخة محضرة من زرق دجاج اللحم ومصبوغة بطريقة كينيون (x2000) 56
19-الشكل 4-6: الكيسة الأريمية البشرية في إحدى العينات ملونة بمحلول لوغول (800 x) 57
20-الشكل 4-7: كيسات الجياردية اللَّمبلِيّة، A: كيسة في لطاخة رطبة من دون أية صباغة، B: كيسات من لطاخات رطبة ملونة بمحلول لوغول (x1000) الشكل 4–6: كيسات الجياردية اللَّمبلِيّة، A: كيسة في لطاخة رطبة من دون أية صباغة، B: كيسات من لطاخات رطبة ملونة بمحلول لوغول (x1000) 58
21-الشكل 4-8: الطور الناشط للجيارديّة اللمبليّة في لطاخة جافة مصبوغة بأزرق الميتيلين(x800) 58
22-الشكل 4-9: بعض العينات الإيجابية نتيجة التفاعل الأول من اختبار Nested-PCR 60
23-الشكل 4-10: بعض العينات الإيجابيّة نتيجة التفاعل الثاني من اختبار Nested-PCR 60
24-الشكل 4-11: نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش(الأوليP/PCR والثاني S/PCR) لعزولة من البوغة الخفية الصغيرة C. parvum عند الإنسان، ونواتج تحليل RFLP 61
25-الشكل 4-12: نواتج تحليل RFLP لست عزولات من البوغة الخفية الصغيرة C. parvum عند العجول الرضيعة 62
26-الشكل 4-13: نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش الثاني S/PCR لإحدى عينات البوغة الخفية الأندرسونية C. andersoni ، ونواتج تحليل RFLP 63
27-الشكل 4-14: نواتج تحليل RFLP لإحدى العزولات من البوغة الخفية البيلية C. baileyi عند الدجاج 64
28-الشكل 4-15: البيوض المتكيسة المتكدسة بعد عزلها وتنقيتها 65
29-الشكل 4-16: البيوض المتكيسة بعد عزلها وتنقيتها 66

فهرس الجداول:

1-الجدول 2-1: أنواع البوغيات الخفيّة المثبتة عالمياً وذات التسميات المعتمدة 10
2- الجدول 2-2: قياسات (أبعاد) البيوض المتكيّسة عند بعض أنواع البوغيات الخفية 26
3- الجدول 3-1 : عينات الدراسة موزعة تبعاً لأثويائها والمحافظة التي جمعت منها 39
4- الجدول 3-1: مكونات محلول أم من دارئة الرحلان (TAE (10X 44
5- الجدول 3-2: شواكل التقطيع Profiles لأهم أنواع البوغيات الخفية عند الإنسان والأبقار والدجاج باستخدام إنزيمات التقييد 46
6- الجدول 3-3: تركيب دارئة التحميل مع SDS %1 (وفق توصيات شركة Thermo) 46
7- الجدول 4-1: عدد العينات البقرية المصابة موزعة تبعاً لمصدرها وعمر الحيوان 54
8- الجدول 4-2: عدد قطعان دجاج اللحم المصابة موزعة تبعاً لمصدرها، ونسبتها المئوية 56
9- الجدول 4-3: الطفيليات الأوالي (من غير البوغيات الخفيّة) المُشخَّصة في براز الأطفال 58
10- الجدول 4-4: عدد العينات الإيجابية بعد كل من المرحلة الأولى والثانية من تفاعل Nested-PCR 59
11- الجدول 4-5: أنواع البوغيات الخفية المشخصة نتيجة تحليل RFLP في العينات بحسب مصدرها 64
12- الجدول 4-6: متوسطات أعداد البيوض المتكيسة المطروحة في غرام البراز OPG خلال أيام التجربة عند حيوانات الهمستر المثبطة وغير المثبطة مناعياً 68

فهرس المخططات:

1- المخطط 4-1: متوسطات أعداد البيوض المتكيسة المطروحة في غرام البراز خلال أيام التجربة عند حيوانات الهمستر المثبطة مناعياً 67
2- المخطط 4-2: متوسطات أعداد البيوض المتكيسة المطروحة في غرام البراز خلال أيام التجربة عند حيوانات الهمستر غير المثبطة مناعياً 68
3 المخطط 4-3: متوسط عدد البيوض المتكيسة الموجودة في 1 ml من السائل السقائي المشيمائي 69

-الفصل الأول-

المقدمة

Introduction

1- المُقدّمة: Introduction

ماتزال الأمراضُ الطفيلية ومسبباتها إحدى أهمِّ مجالات البحث والدراسة على مستوى العالم في المجال الطبي، وذلك نظراً لتنوعها الكبير وللمشاكل الصحية والخسائر المَهُولة التي تسبِّبها للإنسان والحيوان، ولم يستطع العلماء إلى يومنا هذا إيجادَ علاجاتٍ أو لِقاحاتٍ أو حلولٍ مُرضِيةٍ تمكنهم من وقف تمدُّد وتوسع انتشار الكثير من هذه المسببات المَرضيَّة. (Beeching and Gill, 2014)

تَنتشرُ في القطر العربي السوري الكثير من المسببات المرضية الطفيلية (مفصليات الأرجل Arthropods، والديدان Helminthes، والأوالي Protozoa) وتشكل تحدياً حقيقياً للمهتمين بمجال صحة الحيوان والإنسان معاً، وتعد البوغيات الخفية *Cryptosporidium* إحدى تلك الطفيليات الأوالي الهامة، إذ تصيب طيفاً واسعاً من الثدييّات والطيور والأسماك وحتى الزواحف مؤدية إلى أعراض مرضيّة مختلفة لعل أهمّها الإسهال، بالإضافة إلى أن العديد من أنواعها ينتقل من الحيوان إلى الإنسان وبالعكس، وتكون مضاعفات الإصابة بها أشد وطأة وأكثر تأثيراً عند الأطفال والحيوانات صغيرة السن، وأيضاً عند الأثوياء مكبوتي أو ناقصي المناعة، وبالرغم من الدراسات والجهود العلمية المبذولة لم يتمكن العلماء حتى الآن من تصنيع أو تحضير لقاح واقٍ أو علاج جيّد الفعّالية لهذا المسبب المرضي الطفيلي.(Ryan et al., 2016)

مضى أكثر من 100 عامٍ على اكتشاف البوغة الخفية لأول مرة من قبل العالم Ernest Edward Tyzzer (Tyzzer, 1907) في الغدد المعدية عند فئران المختبر، واستطاع أن يلاحظ لديها منذ ذلك الوقت نمطي التكاثر اللاجنسي والجنسي والذي تلاه تشكل الأبواغ spores (البيوض المتكيّسة Oocysts) وخروجها مع البراز وإحداثها للخمج في الفئران غير المصابة بعد ابتلاعها، وعلى الرغم من أنه لم يكن متأكداً من موقع هذا الطفيلي الجديد تصنيفياً إلا أنه أسماه البوغة الخفية الفأرية *Cryptosporidium muris*.

أَتْبعَ العالم Tyzzer بحثهُ الأول بعمل آخر عام 1910 لاحظ من خلاله إمكانية إحداثِ الإصابة بالطفيلي السابق في أنواع أخرى من القوارض والفئران. وأطلقَ هذا العالم اسم البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* لأول مرة عام 1912 على نوعٍ سَجَّلَ وجودهُ في الأمعاء الدقيقة عند الأرانب، كما يعود الفضل إليه أيضاً في تسجيل أول إصابة بالبوغيات الخفية عند الطيور (الدجاج تحديداً) عام 1929.(Fayer et al., 1997)

تتالت الأعمال والأبحاث بعد العالم Tyzzer كاشفةً المزيد من صفات هذا الطفيلي وأنواعه المختلفة، ولكن وبالرغم من ذلك لم تحظَ البوغيات الخفية ولفترة طويلة بالاهتمام المطلوب على الصعيدين الطبي والاقتصادي، إلا أن حَدَثين هامين أجبرا العلماء والمهتمين بالمجال الصحي على إعادة النظر بأهمية البوغيات الخفية وإدراجها ضمن أولوياتهم وتخصيص الفرق البحثية والمخابر المرجعية والامكانات اللازمة لدراسة هذا المسبب المرضي وفهمه بشكل أعمق وأكثر دقة هما:

الحدث الأول هو الانتشار الواسع والوبائي لفيروس نقص المناعة البشري HIV وارتباطه بظهور حالات مرضيّة شديدةٍ ناجمة عن البوغيات الخفية وكثيراً ما أفضت إلى الوفاة نتيجة الإسهال المعنِّد وغير القابل للشفاء، وهذا ما ولَّد رغبةً لدى العلماء لدراسة هذا الطفيلي والتعرف عليه بشكل أكبر.

الحدث الثاني هو جائحة داء البوغيات الخفية المنقولة مع المياه the waterborne cryptosporidiosis outbreak والتي حصلت في Milwaukee التابعة لولاية ويسكنسون في الولايات المتحدة الأمريكية عام 1993، والتي دُعِّمت بمقالة نشرت عام 1994 سلطت الضوء على أهمية هذا الطفيلي (Mac Kenzie et al., 1994) كأحد الأمراض المنقولة مع مياه الشرب.

بعد ذلك حدثت جوائحٌ أخرى في الولايات المتحدة الأمريكية وأوروبا وخاصة في المملكة المتحدة، أكدت على أهمية هذا المسبب، كما دُرِستْ أنواعه عند الحيوانات المختلفة وتأثيراتها المرضية وخاصة عند صغيرة السن منها، وحُدِّدَ الكثير من الأنواع المشتركة بين الإنسان والحيوان، وساهمت الطرائق التشخيصية والبحثية المتنوعة والحديثة لاسيما الجزيئية منها في إعطاء صورة أوضح عن العلاقات التي تربط فيما بين أنواع البوغيات الخفية وتحت أنماطها subtypes مع أثويائها.

لكن ومع الأسف مازال الانتشار الحقيقي للبوغيات الخفية وأنواعها والخسائر التي تسببها مجهولةً في كثير من دول العالم النامية والفقيرة، وتفتقر معظم مخابرها الطبية (البشرية منها والبيطرية) إلى أبسط طرائق الكشف عن وجود هذا الطفيلي الأمر الذي دعا منظمة الصحة العالمية إلى إدراج داء البوغيات الخفية ضمن الأمراض المهملة على مستوى العالم Neglected Diseases عام 2004 (WHO, 2013) .

يستطيع الباحث في الأوراق العلمية أن يجد بعض المقالات التي درست هذا الطفيلي عند الإنسان والحيوان في سورية إذ سُجِّل وجود البوغيات الخفية لأول مرة عند الإنسان عام 1995 (Ismail, 1995)، وعند الحيوانات عام 1997 (قطرنجي، 1997)، ولكن توقفت حدود النتائج في جميع الأعمال عند تحديد الجنس Genus بشكل عام ولم تتطرق أبداً إلى تحديد الأنواع، أو أنها افترضت وجود نوع محدد استناداً إلى الصفات الشكلية والتي لا تشكل قطعاً معياراً أو مقياساً صحيحاً أو دقيقاً في هذا المجال.

ونظراً لأهمية البوغيات الخفية وتأثيرها على الناحيتين الصحية والاقتصادية عند الإنسان والحيوان، وباعتبار أن الدراسات التي أنجزت في سورية اقتصرت فقط على دراسة انتشار هذا المسبب كجنس ولم تتطرق إلى تحديد الأنواع، بالإضافة إلى أن أي دراسة جزيئيّة دقيقة مستقبلية يجب أن تستند إلى تصنيفٍ دقيقٍ وعلى نموذج حيواني (حيوان تجارب) مناسب كان لابد من القيام بعمل أعمق وأشمل يؤسس لما سوف يليه من أعمال، **ولذلك هدفت هذه الدراسة إلى:**

1- عزل البيوض المتكيّسة للبوغيات الخفية من مصادر بشرية وحيوانية مختلفة ضمت الأطفال دون سن الخامسة، ودجاج اللحم، والأبقار والعجول الرضيعة .

2- تنميط أنواع البوغيات الخفية جينياً بهدف معرفة أهم الأنواع التي تصيب الإنسان والحيوان في سورية.

3- تنمية وإكثار أهم الأنواع المشخصة وذلك لدى حيوانات التجارب وأجنة البيض وتحديد أفضل الطرائق لذلك.

4- الكشف عن الأوالي الطفيلية الأخرى في براز الأطفال.

Ernest Edward Tyzzer (August 30, 1875 **to** January 23, 1965)

-الفصل الثاني-

سرد الأبحاث

Literature Review

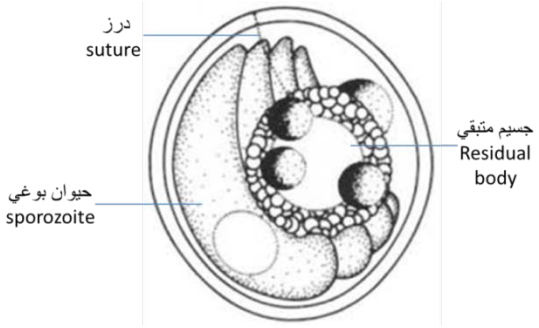
2–سرد الأبحاث Literature Review

2–1– وصفٌ وتعريف: Definition and Description

تُعرَّف البوغيات الخفيّة بأنها من الطفيليات وحيدات الخلية Protozoa التي تصيب طيفاً واسعاً من الأثوياء الفقارية Vertebrate hosts تَشمل الثديّات بما فيها الإنسان والطيور والزواحف والأسماك والبرمائيات، ويُشكّل العديد من أنماط الخلايا الظهارية والظهارية المعوية خاصةً الهدفَ الأساس لهذه الطفيليات (Smith et al., 2007)، حيث تنمو وتتطور في كافة مَراحلها على الحافة الزُّغيبية لهذه الخلايا microvillus border والتي تسميها بعض المراجع بالحافة الفرشاتية للخلايا، وينتج عن هذا التطور موت الخلايا المصابة، وتكاثر الطفيلي لا جنسياً وجنسياً، ويؤدي هذا التطور في النهاية إلى طرح ما يُسمّى بالبيضة المتكيّسة Oocyst إلى الوسط الخارجي مع البراز أو نواتج الإسهال، أو حتى مع مفرزات الجهاز التنفسي في بعض الحالات.

تكون البيضة المتكيّسة متبوغةً عند خُروجها من الثويّ (العائل) المصاب وتمثل الطور الخَامِج (المُعْدي) infective stage في دورة تطور البوغيات الخفيّة، وتختلف قياساتها باختلاف أنواعِ هذا الطفيلي، وتتراوح عموماً بين 3 و8.5 ميكرون (وعند البوغة الخفية الصغيرة 4.5–5 ميكرون)، وهي ذاتُ شكلٍ كرويٍ أو بيضويٍ (Fayer et al., 1997).

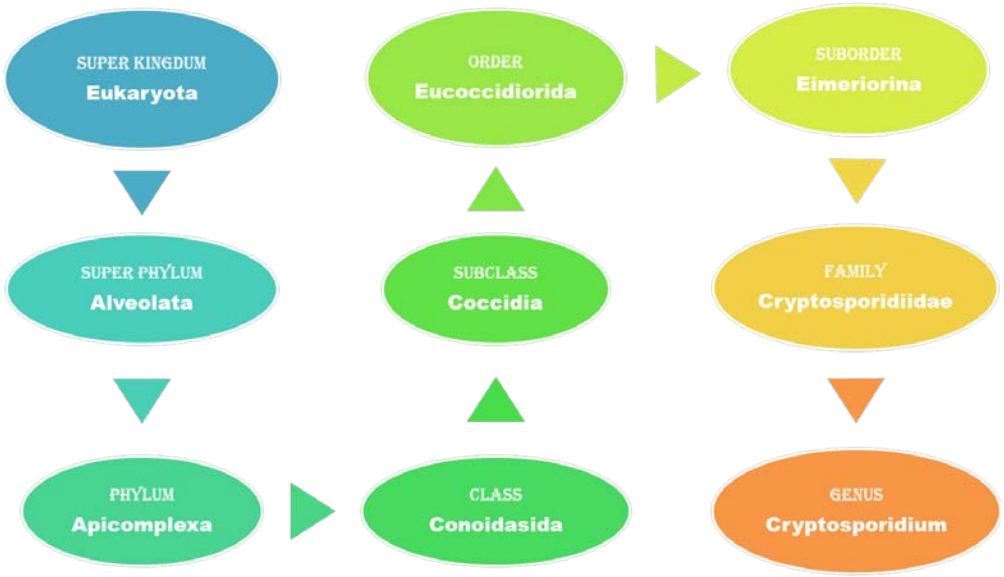
تحتوي كل بيضة متكيسة على أربعة حيوانات بوغية Sporozoites، وعلى جسيم متبقٍ، ويكون جدارها مضاعفاً ومؤلفاً من طبقتين ويحتوي على درز (الشكل 2–1). وتفتقر هذه البيضة المتكيّسة إلى العديد من مكونات البيوض المتكيّسة عند الأجناس الأخرى من الأكريات Coccidia التي تتبع شعبة معقدات القمة Apicomplexa (الأيمريات *Eimeria* spp. والمقوسة القندية *Toxoplasma gondii* وأُسَويّة الأبواغ *Isospora* spp. وغيرها) كوجود النقير Micropyle، والكيسات البوغية Sporocystes ، والحبيبات القطبية Polar granules (Petry, 2004; Tzipori and Widmer, 2000).



الشكل 2–1 : البيضة المتكيّسة عند البوغيات الخفيّة (Current and Blagburn, 1990)

2-2-التصنيف والتصنيف الجزيئي: Taxonomy and Molecular Taxonomy

تندرج البوغيات الخفيّة تحت شـُعبة مُعقَّدات القِمة Phylum: Apicomplexa ورتبة الأكريـات الحقيقية Order: Eucoccidiorida (والتي تضم أيضاً المقوسة القندية، والكيسات اللحميّة، والأيمريّات وغيرها) ويمكن التدقيق في التصنيف كاملاً وفق ما ورد في NCBI (National Center of Biotechnology Information) وبعض المصادر الأخرى ضمن الشكل (الشكل 2-2).



الشكل 2-2: موقع البوغيات الخفية تصنيفياً NCBI، (Ryan and Hijjawi, 2015)

تشير الأبحاث التي أُنجزت خلال العقدين الأخيرين والتي اعتمدت على دراسة استقلاب الطفيلي وتفاعلاته الكيميائية الحيويـة وعلى مادته الوراثية، إلى وجود اختلافات تميّزه عن جميع أفراد شعبة معقدات القمة الأخرى Other apicomplexans، إذ لا تحتوي البوغيات الخفيّة على ما يُسمّى بـ الصانعات الخاصّة بمعقدات القمة Apicoplast organelle، كما تختفي عندها المادة الوراثية الموجودة عادة داخل هذه الصانعات وكذلك تلك التي توجد داخل المتقدرات.(Abrahamsen et al., 2004; Xu et al., 2004)

كما يمكن أن يلاحظ المهتمّ أن البوغيات الخفية تمتلك بعض الخصائص الفريدة التي تميزها عن الأُكريات الأخرى ويمكن ذكرها في سبع نقاط وهي:(Ryan and Hijjawi, 2015)

1- تتوضع مراحلها التطورية الداخلية Endogenous developmental stages وتتكاثر داخل الخلية Intracellular عند قمة الخلايا الظهارية المصابة، ضمن فجوة تسمى بالفجوة الحاملة للطفيل

Parasitophores vacuole وتحت الغشاء الخلوي Cell membrane ولكن في الوقت نفسه خارج هيولى الخلية المضيفة Extracytoplasmic .

2- يتم ارتباط الفجوة الحاملة للطفيلي مع الخلية المضيفة بوساطة بنية غشائية متطورة تُسمى بعضو التغذية Feeder organelle الذي يسهل عملية الحصول على المواد الغذائية وقبطها من الخلية المصابة.

3- يوجد نمطان من البيوض المتكيّسة المتشكلة، إحداها ثخينة الجدار وأخرى رقيقة الجدار مسؤولة عن الخمج الذاتي Auto-infection (كما سيوضح في دورة الحياة).

4- يُعدُّ حجم البيوض المتكيّسة للبوغيات الخفية الأصغر بين جميع الأكريات .

5- عدم فعاليّة الأدوية المضادة للأكريات Anti-coccidial drugs عند استخدامها في علاج البوغيات الخفية. (Blagburn and Soave, 1997; Cabada and White, 2010)

6- وجود تفاعل مناعي متصالب مع القطعانيات Gregarines عند استخدام أضداد وحيدة النسيلة خاصة بالبوغيات الخفية.

7- لدى دراسة تطور البوغيات الخفية ودورة حياتها في المختبر (الأنبوب) *in vitro* باستخدام خلايا أو أوساط مزرعية مناسبة لوحظ وجود أطوار غير مألوفة خارج خلوية شبيهة بالعرسيات Novel gamont-like extracellular stages تماثل نظيراتها الموجودة في دورة تطور القطعانيّات Gregarines .

. (Hijjawi et al., 2004; Hijjawi et al., 2002; Karanis and Aldeyarbi, 2011)

وانطلاقاً مما سبق لابد هنا من ذكر تعريفٍ موجزٍ عن **القُطعانيّات**، إذ إنها وحيدات خلية كبيرة الحجم (قد يصل قياس بعض أنواعها حتى نصف ملم) تشكل مجموعةً تتبع تصنيفياً لشعبة معقدات القمة وتسمى Gregarinasina أو Gregarinia، وتصيب الكثير من أنواع اللافقاريات، ولم يسجل وجودها إطلاقاً عند الفقاريات. (Carreno et al., 1999)

إن المعلومات والبيانات التي تم الحصول عليها من الدراسات الجزيئية تشير إلى وجود رابطة قرابة مورثية قوية Phylogenetic association بين طفيليات القطعانيّات والبوغة الخفيّة، وهي أهم من تلك التي تجمع بين البوغة الخفية وباقي الأكريات، ودَعَمَتْ البياناتُ المأخوذة من تحليلِ كامل الجينوم للبوغة الخفية ومقارنتها مع تلك الخاصة بجينوم إحدى أنواع القطعانيات *Ascogregarina taiwanensis* وجود هذه القرابة . ولكن وفي الوقت نفسه تم ملاحظة العديد من الميزات والخصائص التي تجمع بين القطعانيات

والبوغة الخفية من جهة وباقي الأكريات من جهة أخرى، ومن هذه الميزات اشتراكها بوجود طور البيضة المتكيّسة في الوسـط الخارجي، وكذلك ببعض السبل الاستقلابية والتي منها الإنزيمات التخليقية Synthetic enzymes الخاصة بمتعدد الكيتيد Polyketide وبالأحماض الدهنية من النمط الأول the Type I Fatty acid، وكذلك تماثلها بعدد من الوحدات البنائية البروتينية الخارج خلوية المحافظة conserved Extracellular protein domain architectures. (Templeton et al., 2010) وستبين الدراسات والتحاليل الوراثية المستقبلية لأنواع أخرى من القطعانيات الموقع التصنيفي الأدق للبوغيات الخفية.

يتم اعتماد الأنواع Species delimitation عادةً لدى جميع أجناس معقدات القمة استناداً إلى نقاط أهمها:

-**الصفات الشكلية** بعد الفحص والدراسة باستخدام المجهر الضوئي والمجهر الإلكتروني.

-**وجود دورة حياة فريدة** ومميّزة وواضحة لهذا النوع.

-**نوعيّة الأثوياء.**

وبما أن البيوض المتكيّسة للبوغيات الخفية صغيرة جداً (الأصغر بين معقدات القمة)، ولعدم ملاحظة صفات مميزة لأطوار هذا الطفيلي نستطيع من خلالها التمييز بين الأنواع، فإن الدراسات الشكلية وحدها تُعدُّ غير كافية على الإطلاق لتحديد الأنواع. (Fall et al., 2003)

وذكرت المصادر العلمية بعض المعايير والأساسيات الهامة التي من خلالها فقط يمكن للباحثين تسمية نوع جديد من هذا الطفيلي وهي:(Ryan and Xiao, 2014)

- **دراسة قياسات البيضة المتكيّسة وشكلها .**
- **إجراء توصيف وراثي دقيق Genetic characterization ، مع سَلْسَلَة Sequencing مواقع محددة وإيداعها لدى البنك الجيني GenBank وفق الأصول.**
- **تحديد الأثوياء لهذا النوع، ودراسة النوع عند بعض هؤلاء الأثوياء تجريبياً.**
- **الالتزام والتقيد بالدستور العالمي للتسميات الحيوانية.**

International Code of Zoological Nomenclature (ICZN)

إن موضوع تحديد الأنواع التي تندرج تحت جنس البوغة الخفيّة مازال مَوضِعَ جدلٍ ونقاشٍ كبيرين، ويجري عليه الكثير من التعديل والتطوير بشكلٍ دائم، ويستطيع القارئ أن يميّز أثناء استعراض الكتب والمراجع ذات الصلة وجود ثلاث مجموعات من الأسماء الخاصة بأنواع هذا الطفيلي، مجموعة الأسماء المثبتة والصالحة Valid species names، ومجموعة الأسماء غير الصالحة (الملغاة) Nonvalid species names وهي التي اعتقد بوجودها لفترة ثم توضَّح ما يخالف ذلك، ومجموعة الأنماط الجينية التي

تُنسَبُ إلى الأثوياء التي سجلت عندها هذه الأنواع وهي مازالت قيد الدراسة والبحث للوصول إلى حقيقة ما إذا كانت أنواعاً مستقلة أم لا وكأمثلة عليها: *C.* sp. Deer (Deer genotype)، *C.* sp. Duck (Duck genotype)، *C.* sp. Opossum I and II (Opossum genotypes) وغيرها الكثير.

سجلت المصادر العلمية وحتى تاريخه 29 نوعاً مثبتاً تمتلك تسميات صالحة ومعتمدة (الجدول2-1) [31 وفق(Ryan et al., 2016)]، ثلاثة منها تصيب الطيور، و 21 تصيب الثديّات، ونوعٌ واحد عند البرمائيات، ونوعان عند الزواحف، ونوعان عند الأسماك.

الجدول 2-1: أنواع البوغيات الخفيّة المثبتة عالمياً وذات التسميات المعتمدة

(Kvac et al., 2016; Nakamura and Meireles, 2015; Ryan and Hijjawi, 2015; Ryan et al., 2015; Ryan and Xiao, 2014)

Mammals الثديّات	Fish الأسماك	Birds الطيور
[h] *Cryptosporidium muris*, البوغة الخفية الفأرية [h,b,c] *Cryptosporidium parvum*, البوغة الخفية الصغيرة *Cryptosporidium wrairi*, [h] *Cryptosporidium felis*, البوغة الخفية القطية [h,b] *Cryptosporidium andersoni*, البوغة الخفية الأندرسونية [h] *Cryptosporidium canis*, البوغة الخفية الكلبية [h] *Cryptosporidium hominis*, البوغة الخفية البشرية [h] *Cryptosporidium suis*, البوغة الخفية الخنزيرية [h,b] *Cryptosporidium bovis*, البوغة الخفية البقرية [h] *Cryptosporidium fayeri*, البوغة الخفية الفايرية *Cryptosporidium macropodum*, البوغة الخفية الكنغرية [b] *Cryptosporidium ryanae*, البوغة الخفية الريانية *Cryptosporidium xiaoi*, البوغة الخفية الزياوية [h] *Cryptosporidium ubiquitum*, البوغة الخفية المنتشرة [h] *Cryptosporidium cuniculus*, البوغة الخفية الجحرية [h] *Cryptosporidium tyzzeri*, البوغة الخفية التايزرية [h] *Cryptosporidium viatorum*, البوغة الخفية الركابية [h] *Cryptosporidium scrofarum* [h] *Cryptosporidium erinacei*، البوغية الخفية القنفذية *Cryptosporidium proliferans*، البوغة الخفية التكاثرية *Cryptosporidium rubeyi*	*Cryptosporidium molnari* *Cryptosporidium huwi*	[c,h] *Cryptosporidium meleagridis*، البوغة الخفية الرومية [c,*] *Cryptosporidium baileyi*، البوغة الخفية البيلية [c] *Cryptosporidium galli*، البوغة الخفية الدجاجية
		Amphibians البرمائيات
		Cryptosporidium fragile، البوغة الخفية الهشة
		Reptiles الزواحف
		Cryptosporidium serpentis، البوغة الخفية الثعبانية *Cryptosporidium varanii*

[h] : نوعٌ تم تسجيل وجوده عند الإنسان. [*] : ذكرت بعض المصادر أن هذا النوع يوجد عند الإنسان لكن تم التراجع عن ذلك مؤخراً.

[b] : نوعٌ تم تسجيل وجوده عند الأبقار والعجول.

[c] : نوعٌ تم تسجيل وجوده عند الدجاج.

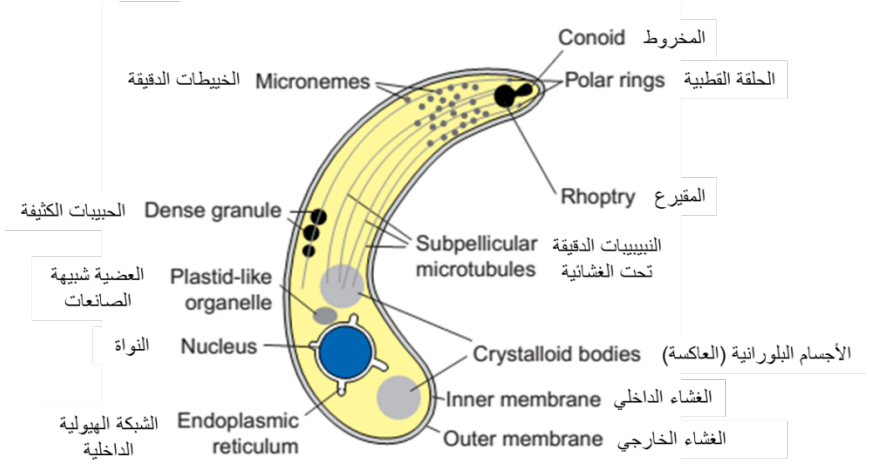
وهنالك بالإضافة إلى الأنواع السَّابقة أكثر من 40 نمطاً جينيّاً Genotyps يمتلك العديد منها ما يؤهلها لأن تُعتَمَد كأنواعٍ مثبتةٍ ولكن بعدَ استكمال دراسة صفاتها البيولوجية والجزيئية.
(Ryan and Hijjawi, 2015; Ryan et al., 2015; Ryan and Xiao, 2014)

2-3-دورة الحياة والزارعة الخلوية : Life Cycle and Cell Cuture

تُعدّ البوغيات الخفية طفيليات وحيدة المثوى Monoxenous ، وتَضمُّ دورة حياتها تكاثراً لاجنسياً تتبعه مرحلة تكاثرٍ جنسي، وتصاب (يحدث الخمج) الأثوياء بابتلاع البيوض المتكيّسة المتبوغة Oocysts الموجودة في الوسط الخارجي مع الطعام والشراب الملوثين، أو عن طريق استنشاقها.

تتحرر الحيوانات البوغية الأربعة من البيضة المتكيّسة من منطقة الدرز Suture تحت تأثير عوامل عديدة أهمها حرارة الجسم و درجة الـ pH (حموضة المعدة، وقلوية الأمعاء)، كما تسرّع وتساعد كل من أملاح الصفراء وإنزيمات الأمعاء والمعثكلة في هذه العملية، وكشفت الدراسات أن الأنواع التي تصيب المعدة (كالبوغة الخفية الفأرية مثلاً) تكون عملية الخروج والتحرر للحيوانات البوغية من البيضة المتكيسة لديها Excystation أسهلُ وأسرع من تلك التي تُصيب الأمعاء.

تمتلك الحيوانات البوغية للبوغيّات الخفية في مقدمتها ما يسمى بالمُعقَّد القمّي Apical complex والذي يوجد عادة لدى جميع أفراد شُعبة معقدات القمة، والذي يتكون من الحلقة القمية Apical ring والمخروط Conoid والأعضاء الإفرازية (المقيرع الوحيد Single rhoptry والخييطات الدقيقة Micronemes) (الشكل 2-3) ويؤدي هذا المعقد دوراً هاماً في ارتباط الطفيلي وغزوه للخلايا.



الشكل 2-3 : بنية الحيوان البوغي لدي البوغيات الخفية (Smith et al., 2005)

تلتصق الحيوانات البوغية بالخلايا الظهارية المعدية المعوية أو التنفسية معتمدة على العديد من المستقبلات الرابطة ligand–receptors على سطحها وقمتها ومنها GP15 (البروتين السكري 15 كيلو دالتون)- GP40- GP900 - CSL- GP47 وغيرها، يمتد من بعدها المقيرع نحو منطقة الالتصاق وتتحرك الخييطات الدقيقة والحبيبات الكثيفة نحو قمة الحيوان البوغي، ليتم بعدها تحرير محتويات الأعضاء الإفرازية مُحرِّضةً الزغيباتِ السطحية للخلية المضيفة على الإحَاطةَ بالطفيلي وتشكيل الفجوة الحاملة للطفيلي

Parasitophorous vacuole، ويكون داخل هذه الفجوة الحيوان البوغي قد أصبح عملياً داخل الخلية ولكن من دون تماس مباشرٍ مع هيولى الخلية. تحدث إثر ذلك عمليات معقدة تفاعلية بين الطفيلي والخلية المضيفة تؤدي إلى تشكل بنية غشائية هامة تسمى عضو التغذية Feeder organelle والذي يتكون من جزءٍ يكوّنه الطفيلي يدعى بالنيشوب Epimerite، وجزء تكونه الخلية المصابة يدعى بالشريط أو النطاق الكثيف Dense band (الشكل 2-6)، ويعمل عضو التغذية على تسهيل الحصول على المواد الغذائية اللازمة للطفيلي ونموه، كما يحول دون تماسه مع هيولى الخلية، ويتطور بعدها الطفيلي إلى أتروفةٍ كرويةٍ Trophozoites ذاتِ نواة واضحة.

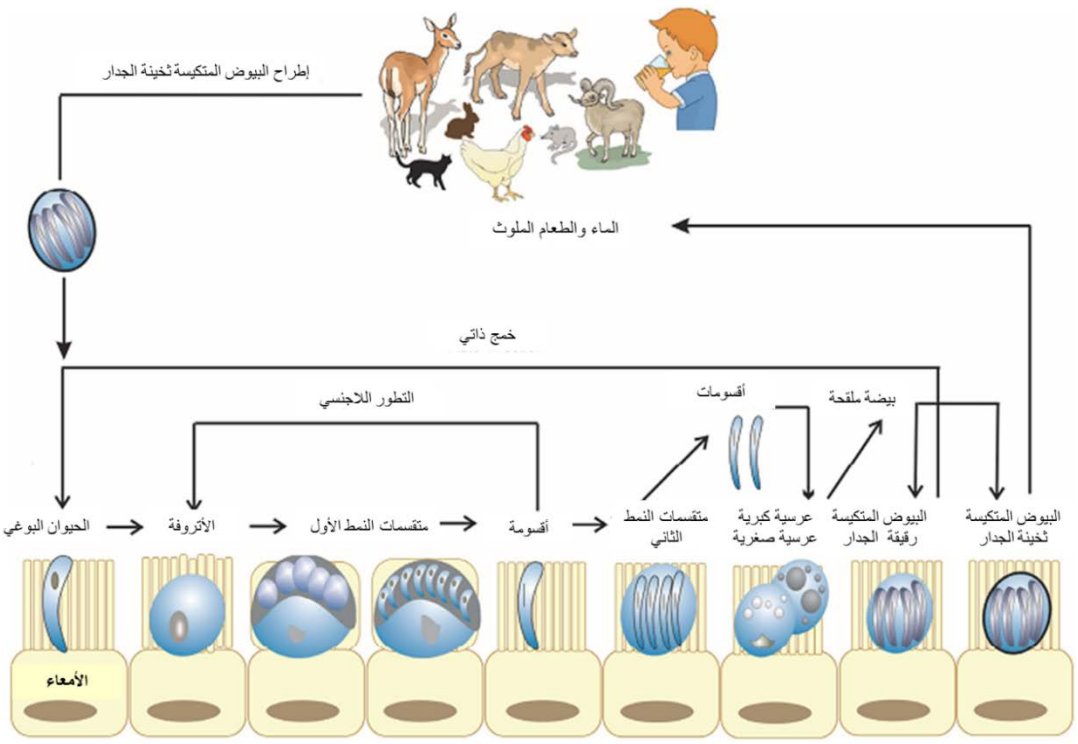
يحدث بعدها التكاثرٌ اللاجنسي إذ تنقسم نواة الأتروفة عدة مرات وتتكون نتيجة لذلك المتقسمة، وتظهر في البداية متقسمات Meronts من النمط I والمحتوية على6-8 أقسومات Merozoites، تخرج هذه الأقسومات بعد تحلل غشاء الخلية وموتها وتغزو خلايا جديدة، لتتطور إلى أتاريف ومتقسمات من النمط I و متقسمات Meronts من النمط II والتي تحتوي على 4 أقسومات Merozoites بعد نضوجها.

يبدأ التكاثر الجنسي عندما تغزو أقسومات النمط II خلايا جديدة وتتحول بعضها إلى عرسيات صغرية Microgamontes (عرسية مكروية) وأخرى إلى عرسيات كبرية (سليفة العرسيات الكبروية) Macrogamontes.(الشكل 2-4) وتصبح العرسيات الصغرية عديدة النوى في المراحل المبكرة من التطور، وعند نضوجها فإن كل نواة تعطي عروساً صغرية (عديمة السياط) والتي تقترن بالعرسية الكبرية لتعطي اللاقحة Zygote. (Caccio and Putignani, 2014; Smith et al., 2005)

تتطور 80% من اللاقحات إلى بيوض متكيسة سميكة الجدار، والتي تتبوغ داخل الجسم وتتحرر من خلية الثوي. ثم تمر تلك البيوض المتكيّسة المتحررة إلى خارج الجسم مع الروث أو البراز وتكون خامجة، وتستطيع بشكل مباشر نقل الإصابة إلى ثوي آخر.

تشكل حوالي 20% من اللاقحات بيوض متكيسة رقيقة الجدار (طبقة واحدة بدلاً من طبقتين)، ولا تُطرَح هذه الكيسات البيضية مع البراز أو الروث، وإنما تتمزق ضمن لمعة الأمعاء محررة الحيوانات البوغية، وتسبب تلك الحيوانات البوغية خَمَجاً طفيلياً ذاتياً Auto-Infection باختراق خلية معوية أخرى. (Fayer et al., 1997)

هنالك نقطةٌ مميزة في دورة حياة البوغة الخفية البيلية *Cryptosporidium baileyi* التي تصيب الطيور وهي أن الباحثين حددوا نمطاً ثالثاً من المتقسمات Type III meront ينشأ من متقسمات النمط الثاني وتحتوي هذه المتقسمة على 8 أقسومات صغيرة، إلا أنه لم يفهم مصير هذه الأقسومات ومسار تطورها حتى الآن.(Fayer, 2008; Fayer et al., 1997)



الشكل 2-4:دورة حياة وتطور البوغيات الخفية عند الإنسان والحيوان(Mohamed, 2014)

وفي دراسة هامة نجح الباحثون (Hijjawi et al., 2002) في تنمية وإكثار البوغة الخفية الأندرسونية على خلايا سرطانية غدية معوية HCT-8 ورصدوا تشكل كافة أطوار ومراحل البوغة الخفية في دورة حياتها، ولكن وخلال هذا العمل لوحظ لأول مرة وجود مراحل خارج خلوية سميت الأطوار خارج الخلوية شبيهة العرسيات Gamont-like extracellular stages، الأمر الذي شكل حلقة غامضة مازال الباحثون يعملون على فهمها حتى يومنا هذا، وأعقب ذلك دراسات كثيرة أكدت على وجود هذه الأطوار خارج خلوية. (Huang et al., 2014; Koh et al., 2013; Rosales et al., 2005)

و شوهدت أيضاً الأطوار الخارج خلوية من قبل (Hijjawi et al., 2004) في أمعاء الفئران بعد إخماجها وإصابتها بالبوغة الخفية الصغيرة، وتعد النقطة الهامة في اكتشاف هذه المراحل أو الأطوار أنها تشبه إلى حدٍ بعيد مثيلاتها في دورة حياة القطعانيات، وبالتالي مَهَّدَت لدراساتٍ جديدةٍ يمكن أن تكشفَ المزيدْ عن مراحل تطورية للبوغيات الخفية في البيئة، مما قد يزيد من المعرفة والادراك حول وبائيتها وكيفية التحكم والسيطرة عليها بما في ذلك إيجاد طرائق علاجية جديدة يمكن استخدامها بفعالية. (Barta and Thompson, 2006)

إن العقبة الأكبر التي تواجه الباحثين في دراسة بيولوجيا هذا الطفيلي وتأثيره وإمراضيته، أو انجاز الأعمال الجزيئية والمناعية حوله هي عدم إمكانية إكثاره مختبرياً في الزجاج *in vitro* بشكل مستمر وثابت، ولا مفر من إكثاره عبر تمريره في الحيوانات المناسبة كالفئران والعجول بالنسبة للبوغة الخفية الصغيرة، أو الخنانيص Piglets واليربوع Gerbils بالنسبة للبوغة الخفية البشرية *C. hominis* وذلك للحفاظ على وجود البيوض المتكيّسة بأعداد كافية تفي باحتياجات الدراسات البحثية في المختبرات. (Hijjawi, 2010)

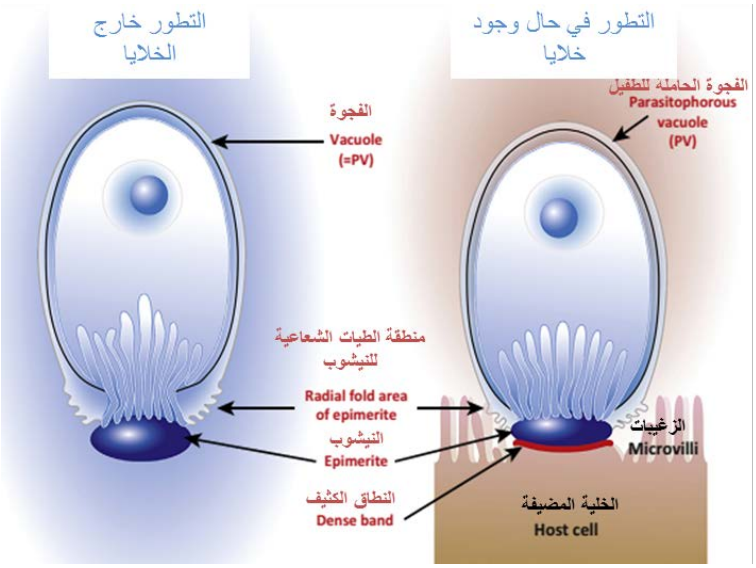
ويذكر الباحثون العديد من الجزئيات الهامة التي تتداخل في عملية الإكثار في الزجاج مختبرياً وتعيقها، وهي تبدأ من بروتوكولات (برامج) الإخراج Excystation protocols ، مروراً بذرية البوغة الخفية المعزولة وعمرها، والطور الواجب إكثاره (البيضة المتكيّسة أم الحيوان البوغي) وعدده، ونوع الخلايا التي تستخدم لإكثار الطفيلي ودرجة الـ pH، وانتهاءً بالوسط المغذي المستخدم وطريقة تحضينها (بظروف هوائية أم مع نسبة من ثنائي أكسيد الكربون)، كل ما سبق ذكره أخَّرَ كثيراً وأعاق إكثار هذه الطفيليات، وحتى وإن تم إكثارها فقد كان بصورة مؤقتة لتجربة ما دون الاستمرارية بها. وتعد الخلايا HCT-8 المفضلة للدراسات الخاصة بالبوغة الخفية الصغيرة وبجو تحضينٍ يحتوي 5% CO2 ، ولكن لا يمكن الاستمرار في إكثار الطفيلي لمدة طويلة Propagate the parasite long-term (فقط لـ 25 يوماً) وبإنتاجية ضعيفة وقليلة من البيوض المتكيّسة Low yields of oocysts.(Hijjawi, 2010; Karanis and Aldeyarbi, 2011; Tzipori and Widmer, 2000)

ومؤخراً وفي دراسة حديثة نالت الاهتمام الكبير من الباحثين استطاع مجموعة من العلماء (Morada et al., 2016) تنمية وإكثار البوغة الخفية الصغيرة على خلايا HCT-8 المزروعة وفق تقانة الأغشية الليفية الجوفاء Hollow Fiber technology ولمدة تجاوزت الستة أشهر وبإنتاجية بلغت 10^8 بيضة متكيسة في اليوم الواحد.

وقامت الباحثة Nawal Hijjawi والتي يعود الفضل إليها باكتشاف الأطوار الخارج خلوية بعملين هامين مع آخرين استطاعوا من خلالهما إكثار البوغة الخفية الصغيرة والبشرية في وسط مغذٍ خالٍ من الخلايا cell-free culture وتابعت تكاثر الطفيلي خلال جميع مراحله التطورية وسجلت وجودها (الشكل 2–5). (Hijjawi et al., 2010; Hijjawi et al., 2004)، ورأى الباحثون أن تطور الطفيلي في الوسط المغذي الخالي من الخلايا يكون بصورة مشابهة إلى حد كبير لما يحصل عند التصاقه بالخلايا من ناحية تكوّن النيشوب وعضو التغذية (الشكل 2–6).

ولم يُعرَف بالضبط منشأ الأطوار الخارج خلوية المكتشفة لكن يعتقد أنها حيوانات بوغية لم تستطع الالتصاق بخلايا ظهارية ومتابعة تطورها. كما ذكرت بعض الأوراق العلمية أنها من الممكن أن تتحول إلى أتاريف أو متقسمات من النمطين الأول أو الثاني في الأوساط أو البيئات المائية Aquatic environments بهدف إنتاج البيوض المتكيّسة في النهاية(Clode et al., 2015) .

الشكل 2–5: دورة حياة البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* في المزارع الخالية من الخلايا(Hijjawi et al., 2004)



الشكل 2–6: تشكل عضو التغذية في الحالة الخارج خلوية وبوجود الخلايا (Clode et al., 2015)

2–4–طيف الاستضافة (الأثوياء): Host Spectrum

كان مُصطلح (نوعية الثوي Host specificity) وإلى وقت قريب كثيرَ التكرار في الأدبيات والمصادر العلمية التي تهتم بالبوغيات الخفية، ولكن ومع تراكم البيانات الآتية من الدراسات الحديثة، وما أتاحته التقانات الجزيئية من تحديد دقيق لأنواع هذا الطفيلي، تمَّ استبدال المصطلح السابق بما يسمى طيف الاستضافة Host spectrum . وللتأكد من طيف الأثوياء وتحديده ومعرفة الأنواع الحيوانية القابلة لأن تكون مضيفاً لنوعٍ أو نمط جينيٍ ما من البوغيات الخفية، يتم الحصول على البيوض المتكيّسة للنوع المدروس من حيوان محدد وتعطى للمضيف المفترض Putative host، ويجب أن تُنجَز دورة الحياة والتطور لدى هذا المضيف كاملةً، وأن تكون البيوض المتكيّسة التي يطرحها مطابقةً جينياً لتلكَ المعطاة (الخامجة) والتي بُدِأ الخمجُ بها، وبعد إتمام ما سبق بنجاح نتمكن من القول إن هذا الحيوان هو ثويٌ آخر إضافيٌ للنَّوعِ أو النمط الجيني المدروس من البوغيات الخفية (Fayer, 2008) .

فمثلاً يمكن أن نعرف الأنواع المسجلة لدى الإنسان والأبقار والدجاج كما يمكن ملاحظة بعض الأنواع المشتركة فيما بين هؤلاء الأثوياء من الجدول (2–1) ولابد من الإشارة هنا إلى أنه كان من المعتقد سابقاً أن الأنواع التي تصيب الطيور لا تصيب الثديّات ولكن تبيّن فيما بعد أن البوغة الخفية الرومية *C. meleagridis* تصيب الإنسان وتأتي في ترتيب أهميتها ثالثةً بعد البوغة الخفية البشرية والصغيرة، وأيضاً البوغة الخفية البقرية بقيت وحتى عام 2010 تعتبر نوعاً مسجلاً عند الأبقار فقط، وحديثاً سجل وجودها في عدة دراسات عند الإنسان. وتعد الأنواع التي تصيب ثوياً واحداً فقط قليلة جداً، كما هو الحال

عند النوع *C. wrairi* الذي يصيب فقط خنازير غينيا ولم يسجل وجوده لدى أي نوع حيواني آخر (Helmy et al., 2013; Khan et al., 2010; Ng et al., 2012) .

وكما ذكرنا آنفا توجد أيضاً بعض الأنماط الجينية (لم تكتمل الدراسات حولها بعد) التي تصيب الإنسان مثل النمط الظرباني والنمط السنجابي الأول skunk and chipmunk I genotypes . كما أنه توجد عدة أنماط جينية تصيب الطيور سجل منها نمطٌ يصيب الدجاج وهو النمط الثاني Avian genotype II . (Nakamura and Meireles, 2015; Ryan and Hijjawi, 2015) .

2-5- داء البوغيات الخفية: Cryptosporidiosis

2-5-1- الوبائية وعوامل الخطورة: Epidemiology and Risk Factors

ينتشر داء البوغيات الخفية عالمياً وبشكل واسع، وتعد البيوض المتكيّسة التي تتبوغ في الجسم قبل طرحها (كما ذكرنا سابقاً) هي الطور الخامج، وبالتالي تكون قادرة على إحداث الخمج مباشرة، وتخرج هذه البيوض المتكيّسة مع براز الأثوياء أو روثها أو حتى مع مفرزات الجهاز التنفسي في بعض الحالات ملوثةً البيئة المحيطة بشكل مباشر، إذ سَجَّلتْ إحدى الدراسات احتواء الغرام الواحد من روث العجول المخموجة تجريبياً على 10^7x4 بيضة متكيسة الأمر الذي يؤدي إلى نشر أعداد هائلة من الطور الخامج لهذا الطفيلي في الوسط المحيط (Fayer et al., 1998) .

هناك عدة عوامل تؤدي أدواراً في وبائية هذا الطفيلي، وتسهم في جعل التحكم والسيطرة عليه أمراً بالغ الصعوبة، فبالإضافة إلى أن البيوض المتكيّسة تقاوم مختلف الظروف البيئية، فإنه لا يوجد إلّا القليل من المعقمات والمركبات الكيميائية المستخدمة عادة ضد الجراثيم والفيروسات تمتلك بعض الفعالية some efficacy تجاه الطور الخامج للبوغة الخفية، ويعود السبب في ذلك إلى أن جدار البيضة المتكيّسة غير قابل للاختراق تقريباً Nearly impenetrable (Mohamed, 2014).

كما أن الحجم الصغير للبيضة المتكيّسة يجعلها قادرة على تجاوز وسائل ترشيح المياه وتنقيتها وبالتالي النفاذ منها والوصول إلى الإنسان والحيوان مع مياه الشرب التي تعد مصدراً هاماً جداً للإصابة، وأشارت الدراسات إلى أن الجرعة الخامجة من البوغيات الخفية تعد قليلة أيضاً إذ قدرت بـ 9 بيوض متكيسة عند الإنسان (Okhuysen et al., 1999) و 50 عند العجول (Moore et al., 2003)، في حين أنه من الممكن أن ينتج الثوي ما يقارب 10^{10} بيضة متكيسة خلال فترة إصابته.

وتتنوع مصادر الخمج بالنسبة للحيوانات، فمن الممكن أن تكون الحيوانات المصابة وخاصة تلك التي لا تظهر عليها أية أعراض أثناء الإصابة وتطرح البيوض المتكيّسة (خمج دون سريري Sub-clinical

infection) هي مصدر الإصابة للحيوانات السليمة الموجودة معها في الحظيرة، أو أن تكون الأدوات الملوثة غير النظيفة المختلفة والمستخدمة في المزرعة، كالمعالف والمشارب وزجاجات وحلمات الإرضاع الاصطناعية بالنسبة للعجول الصغيرة وغيرها، أو حتى ضرع الأبقار بحد ذاته قد يكون من أهم وسائل نقل البيوض المتكيّسة للعجول أثناء الرضاعة في حال تماسه مع الأرضية أو مع روثِ حيواناتٍ مصابة.

ولا بد من الإشارة إلى أن العمال والقائمين على رعاية الحيوانات قد يشتركون بنقل هذا المسبب من حظيرةٍ أو منطقة إلى أخرى عبر أحذيتهم أو ثيابهم، كما يمكن للحيوانات الأخرى كالكلاب والقطط والقوارض وحتى الحشرات أن تقوم بذلك، هذا بالإضافة إلى وسائل النقل (حافلات، وسيارات، ودراجات، و غيرها) والتي قد تلعب دوراً مهماً في نقل الإصابة فيما بين المناطق أو الحظائر والمزارع.

ومن العوامل المهمة التي تؤثر في الإصابة وشدتها عمر الثوي المصاب، فعند الإنسان مثلاً من المعروف أن الأطفال دون سن الخامسة هم الأكثر إصابةً وتأثراً بالبوغيات الخفية (Hunter et al., 2007)، وعند الدجاج أيضاً لم تلاحظ الأعراض التنفسية عند الطيور التي يزيد عمرها عن أسبوعين والمصابة بالبوغة الخفية البيلية *C. baileyi* كما كانت أعداد البيوض المتكيّسة التي طرحتها طيور مصابة عمرها أسبوعٌ واحدٌ ثلاثة أضعاف تلك التي طرحتها طيورٌ بعمر 9 أسابيع (Ryan and Xiao, 2008).

وذكرت الدراسات وجود علاقة بين العمر ونوع البوغة الخفية التي تصيب الأبقار إذ تصيب البوغة الخفية الصغيرة *Cryptosporidium parvum* العجول الرضيعة، وتصيب البوغة الخفية الأندرسونية *C.andersoni* العجول الأكبر عمراً والأبقار الكبيرة، في حين تصيب كل من البوغة الخفية البقرية *C.bovis* والبوغة الخفية الريانية *C.ryanae* العجول بعد مرحلة الفطام Post-weaned calves بين (2) و (11) شهراً (Keshavarz et al., 2009; Santin, 2013)، كما أن سلالات الأبقار الخاصة بإنتاج الحليب عادةً ما تتأثر بشكل أكبر من سلالات إنتـاج اللحم (de Graaf et al., 1999).

تُسهِم عدة مسببات مرضية في حالِ تَرافَقَ وجودها مع البوغيات الخفية بزيادة شدة الإصابة وخطورتها ولعل أشهر مثال على ذلك هو ترافق الإصابة بالبوغة الخفية عند الإنسان مع فيروس نقص المناعة المكتسب، إذ تؤدي حينها إلى حدوث إسهال مزمن غير قابل للعلاج وكثيراً ما يفضي إلى الوفاة (Hunter et al., 2007).

وتعد كل من الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان المعوي Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) والفيروسات العَجَليّة Rotavirus والفيروسات المكلَّلة (التاجية) Coronavirus بالإضافة إلى طفيلي البوغة الخفية المسببات الرئيسة للإسهال عند العجول الرضيعة والحديثة الولادة، وتؤدي في حال تشاركها إلى إسهال معقدٍ وشديد وصعبِ العلاج وكثيراً ما ينتهي بالنفوق (Foster and Smith, 2009).

2-5-2- فترة الحضانة والأعراض: Incubation Period and Symptoms

2-5-2-1- عند الإنسان: In Human

يوجد أكثر من 20 نوعاً من البوغيات الخفية تصيب الإنسان، علماً أن البوغة الخفية البشرية *C. hominis* والبوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* مسؤولتان عن اكثر من 90% من الإصابات حول العالم، وتأتي أنواع البوغة الخفية الرومية *C. meleagridis* والبوغة الخفية الجحرية *C. cuniculus* (خاصة في المملكة المتحدة) في المرتبة الثانية من حيث الأهمية (Chalmers and Katzer, 2013; Ryan et al., 2016)، أما باقي الأنواع فهي أقل أهمية من ناحية الانتشار وحتى في شدة الأعراض.

تقدر فترة الحضانة وسطياً بعد الخمج بـ(5-7) أيام، ويمكن أن تتراوح بين 3 و 14 يوماً، علماً أن هذه الفترات هي حصيلة دراساتٍ أجريت على ثلاثة أنواع منها هي البوغة الخفية البشرية والصغيرة والرومية (Caccio and Putignani, 2014).

تظهر الأعراض بعد فترة الحضانة والتي تتمثل بالإسهال الذي يكون عادة غزيراً ومائي القوام، وقد يشاهد فيه المخاط ونادراً ما يحتوي على الدم. ويستمر الإسهال عادة عند المرضى الأسوياء مناعياً Immunocompetent لحوالي (6-9) أيام يشفى بعدها المريض (مرضٌ محدود ذاتياً Self-limited disease)، أما عند الأطفال الذين يعانون من سوء التغذية فقد يستمر لأكثر من أسبوعين أو ثلاثة أسابيع وبالتالي يحدث التجفاف ونقص في كهارل الدم Electrolytes عندهم. هذا بالإضافة إلى أعراض أخرى من الممكن أن تترافق مع داء البوغيات الخفية كالترفع الحروري (أقل من39 ْ)، والمغص Abdominal cramps والألم العضلي، والتعب Fatigue، والقهم Anorexia ، والصداع والغثيان Nausea.

ولابدّ من الإشارة هنا إلى أنّ الأطفال دون السنتين من العمر و كبار السن هم الأكثر قابلية سواءً للإصابة أو لشدتها واستمراريتها.

ويستمر الإسهال عند ناقصي المناعة Immunocompromised لفترة طويلة تتراوح من أسبوعين إلى أشهر، ويعد هذا المرض من الأمراض الهامة التي تهدد حياتهم.

(Caccio and Putignani, 2014; Current and Blagburn, 1990; Warren and Guerrant, 2008).

يعاني بعض الأفراد من خلل مناعي وراثي وهو عبارة عن نقص في وظائف الخلايا اللمفاوية التائية، كما يعاني آخرون مما يسمى العوز المناعي المشترك الشديد Severe combined immune deficiencies (SCID)، أو يلاحظ لدى البعض الآخر انخفاض في أعداد الخلايا التائية المساعدة ($CD4^+$) والناجم عن الإصابة بمرض الإيدز مثلاً أو عن الأدوية المثبطة للمناعة Immunosuppressive therapy والتي تعطى للمريض في حالات نقل الأنسجة والأعضاء، وكل هؤلاء

الأفراد يعدُّون ناقصي أو مكبوحي المناعة، وبالتالي هم عرضةٌ للإصابةِ بحالاتٍ شديدةٍ من داء البوغيات الخفية. ومن المعروف أن ظهارة الأمعاء الدقيقة هي الهدف الرئيس للأنواع التي تصيب الإنسان، إلا أنه ولدى الأشخاص ناقصي المناعة سجلت حالات عديدة ظهرت فيها إصابات خارج معوية أهمها كانت الإصابات التنفسية بهذا الطفيلي، كما وجدت أطواره في الحويصل الصفراوي والقنوات الكبدية والمعثكلية (البنكرياسية) (Mohamed, 2014).

لاحظ العلماء والباحثون مؤخراً أن الإصابة بالبوغيات الخفية قد تكون مسؤولة عن تشكل وظهور بعض الأورام الهضمية، وأجريت عدة أبحاث على حيوانات التجارب حول هذه النقطة وجميعها أكدت امتلاك هذا الطفيلي القدرة على ذلك (Certad et al., 2012; Certad et al., 2010a; Certad et al., 2010b).

2-5-2-2- عند الأبقار: In Cattle

تصاب الأبقار بأربعة أنواع رئيسة من البوغيات الخفية، وتضم البوغة الخفية الصغيرة والبوغة الخفية الأندرسونية والبوغة الخفية البقرية والبوغة الخفية الريانية (والتي كانت تسمى سابقاً النمط الجيني شبيه الغزالي Deer-Like genotype) (Fayer et al., 2008; Keshavarz et al., 2009)، كما سجل وجود عدة أنواع أخرى عندَ الأبقار والعجول لكنها أقل أهمية من الأنواع السابقة مثل البوغة الخفية الخنزيرية والبوغة الخفية البشرية والبوغة الخفية القطيّة وحتى البوغة الخفية الكلبية وغيرها، لكن لم يحسم الأمر تماماً بشأنها إذ يعتقد أن بيوضها المتكيّسة ابتلعتها الأبقار مصادفة وطرحتها من دون أن يطرأ عليها أي تغير، وتعد البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* والبوغة الخفية الأندرسونية *C. andersoni* الأكثر أهمية عند الأبقار والعجول (Santin, 2013).

حيث يتطفل النوع *C. parvum* في الأمعاء الدقيقة بشكل رئيس (اللفائفي والعفج، وبشكل أقل في الأعور والقولون) وتشكل حالات الإصابة بهذا النوع 80% من جميع حالات الإصابة بالبوغيات الخفية عند الماشية، وتكون العجول دون الثلاثة أسابيع الأكثر قابلية للإصابة وتقل أهمية المرض عند العجول التي هي بعمر أكبر من (8) أسابيع، وقد تكون الإصابة غير عرضية أو واضحة الأعراض إذ يبدأ الإسهال بعد حوالي (3) أيام عقب الخمج ويستمر لحوالي (4-16) يوماً، ويترافق مع طرح البيوض المتكيّسة بأعداد كبيرة، ويكون الاسهال مائياً وغزيراً Watery profuse diarrhea، ويؤدي إذا ما استمر إلى فقدان الكهارل وحدوث حماض استقلابي Metabolic acidosis، وإلى التجفاف الذي يلاحظ من خلال غور العينين وقلة مرونة الجلد وبرودة الأطراف Coolish acra وفي النهاية العجز العام General infirmity والنفوق، وفي حال الشفاء يكون قد أدى بطبيعة الحال إلى ضعفٍ في النمو وقلةٍ في زيادة الوزن.(Robertson et al., 2014)

وتكون الإصابة أشد خطورة عندما تكون البوغيات الخفية جزءاً مما يسمى (معقد الإسهال عند العجول حديثة الولادة) والذي يضم بالإضافة إلى البوغيات الخفية جراثيم وفيروسات: الإشريكية القولونية المفرزة للذيفان المعوي ETEC، والفيروسات الإكليلية Coronavirus، والفيروسات العجلية Rotavirus، ويشكل معقد الاسهال هذا أحد أهم أسباب خسارة العجول ونفوقها في محطات ومزارع الأبقار.

أما نوع البوغة الخفية الأندرسونية *C. andersoni* (التي كان يعتقد خطأً أنها البوغة الخفية الفأرية *C. muris*) فتتطفل في المنفحة وتحديداً في الخلايا المفرزة لمولد الهضمين (Pepsinogen) وخاصة عند العجول بعد سن الفطام وعند الأبقار البالغة، وعادةً لا تترافق الإصابة بهذا النوع مع إسهال رغم أنه يسبب تراجع زيادة الوزن عند عجول التسمين وانخفاض إنتاج الحليب عند الأبقار (Mohamed, 2014; Robertson et al., 2014; Santín and Trout, 2008) .

2-5-2-3-عند الدجاج: In Chicken

هناك ثلاثة أنواع هامة ومعروفة تصيب الدجاج وهي البوغة الخفية البيلية *C. baileyi* والبوغة الخفية الرومية *C. meleagridis* والبوغة الخفية الدجاجية *C. galli* (بالإضافة إلى بعض الأنماط الجينية والأنواع الأخرى الأقل أهمية)، ويمكن التفريق بين الأنواع السابقة من حيث الأنسجة والأعضاء التي تغزوها وتتكاثر فيها، وأيضاً من حيث شدة الأعراض الملاحظة على الطائر المصاب.

تغزو **البوغة الخفية البيلية** الجهاز التنفسي العلوي والسفلي، والمجمع وجراب فابريشيوس، والملتحمة، وبدرجة أقل الأمعاء والكلى. وتكون الأعراض السريرية التنفسية عبارة عن خراخر rales وسعال وعطاس وضيق تنفس Dyspnea، وزيادة المخاط في الرغامى والتجاويف الأنفية Nasal cavities، ويشاهد أيضاً التهاب الأكياس الهوائية، وتكون الفترة قبل الظاهرة prepatent period لهذا النوع (4-8) يوماً ومتوسط الفترة الظاهرة (14) يوماً، وتزداد الخسائر في قطعان الدجاج عند اشتراك الاصابة بهذا الطفيلي مع مسببات مرضية أخرى كجراثيم الإشريكية القولونية *Escherichia coli*، أو الفيروسات التي تصيب الجهاز التنفسي كفيروس التهاب القصبات المعدي Infectious bronchitis virus، وهو ما يشاهد في معظم الحالات التي سجلت فيها الإصابة بالبوغيات الخفية عند الدجاج، علماً أن الإصابة بالبوغة الخفية البيلية وحدها تستطيع إحداثَ أعراضٍ مرضيةٍ تنفسية، وهو ما تم إثباته تجريبياً Experimentally عند حقن البيوض المتكيّسة حقناً في رغامى الطيور Inoculated intra-tracheally، في حين كانت الإصابة غالباً تحت سريرية وبلا أعراض ملاحظة عندما أعطيت البيوض المتكيّسة عن طريق الفم orally

(Nakamura and Meireles, 2015; Robertson et al., 2014; Ryan and Xiao, 2008).

تتكاثر أيضاً البوغة الخفية البيلية في جراب فابريشيوس وتخرب خلاياه وأنسجته، مما يسبب تثبيطاً مناعياً هاماً، يؤثر سلباً على استجابة الطيور للقاحات المستخدمة، وقد تلاحظ أيضاً بعض الأعراض المعوية ولكن بدرجة أقل من تلك التنفسية والتي تعتبر الأساس والمميزة لنوع *C. baileyi*.

أما فيما يتعلق بداء البوغيات الخفية الكلوي عند الدجاج فإنه يتميز بأنّ الكلى تكون شاحبة ومتضخمة، كما شوهدت أحياناً بلورات البولة Urate في الحالبين، ويعد هذا الشكل من أشكال الإصابة الأكثر ندرة. (Nakamura and Meireles, 2015; Ryan and Xiao, 2008)

تتكاثر **البوغة الخفية الرومية** في الأمعاء، وهي نادراً ما تسبب أعراضاً واضحة عند الدجاج، على عكس تلك التي تسببها عند طيور الرومي إذ تؤدي إلى ضعف النمو والاسهال وامتلاء الأمعاء بالغازات والمخاط (Nakamura and Meireles, 2015). وتوجد دراسات قليلة (Baroudi et al., 2013) ذكر فيها أن البوغة الخفية الرومية استطاعت إحداث إسهال ونفوق عند الدجاج. وأجريت دراسة تجريبية وحيدة أدى فيها الخمج بالبوغة الخفية الرومية عند دجاج اللحم إلى أعراض واضحة تمثلت بالخمول والضعف ونقص النمو، لكن الطيور استعادت نشاطها ونموها الطبيعي بعد أسبوعين من الخمج علماً أن الوزن النهائي للطيور قد تأثر وبشكل واضح نتيجة الإصابة (Tumova et al., 2002).

يصيب النوع الثالث من **البوغيات الخفية *C. galli*** العصافير والحساسين بشكل أساسي وقليلاً ما سجل وجوده عند الدجاج، وهو يتطفل في المعدة الغدية Proventriculus لدى الطيور، ولم يعرف الكثير عمّا تسببه هذه الاصابات للطيور والتي غالبا ما تكون من دون أعراضٍ عند الدجاج، إلا أنها عند طيور أخرى تترافق مع أعراض واضحة كالإسهال وخسارة الوزن ونسب عالية من النفوق
. (Blagburn et al., 1990; Morgan et al., 2001; Ryan and Xiao, 2008)

ولابد هنا من الإشارة إلى أن الخسائر الكبيرة التي تسببها البوغيات الخفية في تربية الدجاج ناجمة أساساً عن ضعف وتأخر النمو وزيادة معامل التحويل العلفي وخاصة عند دجاج اللحم، بالإضافة إلى الأدوية المهدورة في محاولات العلاج غير الناجحة نظراً لغياب علاج مُرضٍ ودواء فعّال يؤثر على هذا الطفيلي (Nakamura and Meireles, 2015).

2-5-2- الآلية الإمراضية والفيزيولوجية المرضية: Pathological Mechanism and Pathophysiology

يعد الاسهال وما ينجم عنه من آثار مرضية مختلفة (كالحمّاض Acidosis والتجفاف Dehydration ونقص الشوارد وغيرها) النقطة الأساس عند الإصابة بالبوغيات الخفية، وتختلف طريقة وآلية حدوث الاسهال عموماً تبعاً لسببه (خمجي، تسممي، غذائي، استقلابي، خلل في عمل الجهاز الهضمي،.... الخ)، وتتباين

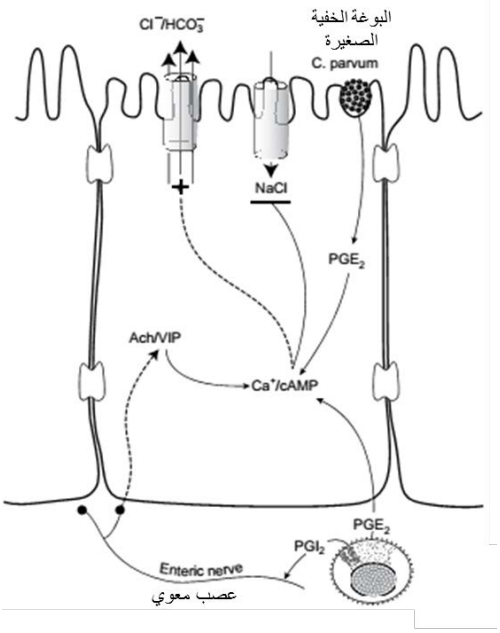
أيضاً هذه الآليات في الأمراض المعدية المؤدية للإسهال تبعاً للعامل المرضي المسبب، ولفهم كيف يحدث الاسهال الناجم عن داء البوغيات الخفية لابد من معرفة التغيرات التي تحصل على مستوى الخلية المعوية والأمعاء بشكل عام.

تؤدي الإصابة بهذا الطفيلي إلى تخريب الخلايا الظهارية وخسارتها، وضمور الزغابات المعوية Villus atrophy، كما يحدث ارتشاحٌ بمختلف الخلايا الالتهابية في الصفيحة المخصوصة Lamina propria (كالبلاعم، والعدلات، واللمفاويات)، ويلاحظ أيضاً فرط تنسج الخبايا Crypts المسؤولة عن تجديد الخلايا الظهارية (Foster and Smith, 2009; Mohamed, 2014; Tzipori and Ward, 2002).

ومازال سبب موت الخلايا الظهارية المصابة بالطفيلي موضع نقاش وجدل حتى الآن، إذ يميل بعض الدارسين إلى أنه يحصل نتيجةَ تخرُّب جدار الخلية المضيفة عند خروج الطفيلي، في حين يميل البعض الآخر إلى أن البوغة الخفية تحرّض على حدوث الاستموات Apoptosis (الموت الخلوي المبرمج) في الخلية المصابة، ويحدث هذا التحريض بعد اكتمال نمو الطفيلي وقرب مغادرته الخلية وذلك لاعتماده على الخلية المضيفة في تغذيته ونموه اعتماداً كبيراً جداً، والأمر الذي دعم هذه الفرضية هو أن إعطاء مثبطات الاستموات أدى إلى الإقلال من موت الخلايا في التجارب المخبرية (Chen et al., 2001; Mele et al., 2004).

يؤدي موت الخلايا الظهارية وقصر الزغابات المعوية إلى سوء الهضم وسوء الامتصاص Malabsorption، وبالتالي مرور محتويات الأمعاء من ماء ومواد غذائية وشوارد دون امتصاصها والاستفادة منها بالشكل المطلوب، كما ينتج عن وصول المواد الغذائية غير المهضومة وخاصة الكربوهيدرات إلى الأمعاء الغليظة زيادة التحلل الميكروبي Microbial decomposition وإنتاج الحموض الدسمة قصيرة السلسلة (الطيارة) وهذا ما يرفع من الضغط التناضحي داخل الأمعاء ويضعف عملية إعادة امتصاص الماء بل قد يؤدي إلى خروج الماء باتجاه لمعة الأمعاء الأمر الذي ينجم عنه تفاقم الاسهال.

وتؤدي الاصابة أيضاً إلى الاحتقان وزيادة ورود الدم إلى الأمعاء وتوذمها وارتشاحها بالخلايا الالتهابية التي تفرز العديد من وسائطها Mediators التي تقود إلى زيادة نفوذية الأوعية الدموية Blood vessels permeability وزيادة خسارة الماء والكهارل electrolytes وخروجها من الدم إلى لمعة الأمعاء وبالتالي طرحها مع الاسهال، وتعد البروستغلاندينات (PGE_2,PGI_2) التي تفرزها الخلايا المصابة وخلايا اللُّحمة المتوسطة في الأمعاء Mesenchymal cells (بتحريض من البلاعم) أهم تلك الوسائط النسيجية المعروفة المؤدية إلى زيادة النفوذية بالإضافة إلى دورها في الألم (الشكل 2-7)، حيث تؤثر على عملية امتصاص الشوارد وزيادة اطراحها وافرازها وذلك بتأثيرها على الأعصاب المعوية وعبر سبل إشارية متعددة (Foster and Smith, 2009; Warren and Guerrant, 2008) .



الشكل 2-7: تأثير البروستغلانديات على الخلية الظهارية المعوية (Foster and Smith, 2009)

يؤثر البروستغلاندين PGE2 بشكل مباشر على الخلية، أما البروستغلاندينPGI2 فيؤثر أولاً على الأعصاب المعوية التي تفرز بدورها الأسيتيل كولين (Ach) و VIP (vasoactive intestinal polypeptide) حيث تؤدي في النهاية إلى ارتفاع تركيز شوارد الكالسيوم والأدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي cAMP والتي تنشط عملية طرح الشوارد والاقلال من امتصاصها.

2-6- التشخيص والتنميط الجيني : Diagnosis and Genotyping

2-6-1- التشخيص المجهري: Microscopic Diagnosis

تعتمد الطرائق المختلفة التي تستخدم المجهر في التشخيص على رؤية البيوض المتكيّسة للطفيلي بشكل مباشر، ويتم في معظم الحالات صباغة العيّنة المأخوذة من الإنسان أو الحيوان المصاب بإحدى الملونات المستخدمة لتلوين البوغيات الخفية.

إن الطريقة الأهم في تلوين عينات البراز بهدف تشخيص الإصابة بالبوغيات الخفية والتي مازالت الأكثر انتشاراً حول العالم هي طريقة التلوين الصامدة للحمض لكينيون Kinyoun's acid fast stain والتي تسمّيها بعض المراجع صبغة تسل- نيلسون المعدلة Modified Zeihl-Neelsen (Helmy et al., 2013; Vohra et al., 2012)، ويتلخص مبدأ هذه الطريقة بقدرة ملون الفوكسين الكاربولي على اختراق جدار البيضة المتكيّسة السميك والكتيم من جهة، وعدم قدرة مزيل اللون الحامضي المستخدم (الحمض أو الكحول الحامضي) على اختراق ذات الجدار وبالتالي تحتفظ البيضة المتكيّسة بلون الفوكسين (الأحمر) على عكس باقي مكونات العينة المدروسة (سيتم شرحها تفصيلاً في الفصل الثالث).

من أهم ميزات طريقة كينيون أنها سهلة التنفيذ وقليلة التكلفة ولا تحتاج إلى وقت طويل لإنجازها، ولكن يؤخذ عليها ضرورة تمتع الفاحص بخبرة جيدة وذلك لأن بعض الأبواغ الفطرية والقطيرات الدهنية (خاصة عند الأطفال والعجول الرضيعة) قد تتلون باللون الأحمر بشكل مماثل للبوغيات الخفية كما أن البيوض المتكيّسة لدورية الأبواغ الكيتانية *Cyclospora cayetanensis* التي تصيب الإنسان تعد صامدة للحمض أيضاً ولكنها أكبر حجماً (8–10 ميكروناً) وتكون غير متبوغةٍ عند طرحها مع براز الإنسان. كما أن الحساسية المنخفضة لهذه الطريقة تشكل نقطة هامة، وقد ذكرت بعض المصادر أن الحد الأمثل لكشف الإصابة عند استخدام اللطخة المباشرة من البراز وصبغها بطريقة كينيون هو 10^6 بيضة متكيسة/غرام براز ، ولكن يمكن تحسين حساسية هذه الطريقة وإلى حد كبير باللجوء إلى تطبيق طريقة الفورمول–إيثر التركيزية قبل الصباغة وتلوين الراسب الناتج كاملاً (Smith, 2008; Vohra et al., 2012).

من الطرائق التركيزية المستخدمة في البوغيات الخفية طريقة التعويم، وخاصة التعويم السكري باستخدام محلول Sheather's sugar solution حيث تبدو البيوض المتكيّسة بلون وردي فاتح، ولكن يعاب على هذه الطريقة نوعيتها المنخفضة جداً وصعوبة استخدامها عند وجود شوائب كثيرة بأحجام مماثلة للطفيلي في العيّنة، كما يجب فحص العينات خلال 10 دقائق وإلا تخربت البيوض المتكيّسة. (Vohra et al., 2012)
يوجد أيضاً العديد من الصبغات الأقل استخداماً من صبغة كينيون لتشخيص هذا الطفيلي مثل صبغة جيمسا، وصبغة الأيودين، وصبغة رومانوسكي Romanowsky stain ، وصبغة السافرانين، وصبغة الهيماتوكسيلين–إيوزين للأنسجة في حال إصابتها، والصبغات السلبية والتي تعد طريقة **هاين** Heine أشهرها ويفضل أن تفحص العينات باستخدام المجهر متباين الأطوار Phase-contrast microscope لقدرته على إظهار قرائن الانكسار للأجسام ومحتوياتها بشكل أفضل، ويجب أن تُتْبَعْ بإحدى الصبغات الصامدة للحمض في حال الاشتباه بالإصابة (Vohra et al., 2012).
كما تستخدم الأصبغة المتألقة في التشخيص كصبغة الأورامين– فينول Auramine- phenol ، وتعد الأضداد وحيدة النسيلة الموسومة بمادة متألقة مثل فلورو أيزو ثيوسيانات FITC-*C*-mAbs إحدى أكثر الطرائق المجهرية حساسية ونوعية في الكشف عن وجود البيوض المتكيّسة في اللطاخات المحضرة من العينات المشتبهة، ولكن يقتصر استخدام هذه الطريقة على المراكز البحثية لارتفاع التكلفة واحتياجها لوجود المجهر التألقي (Smith, 2008).
وعلى الرغم من وجود فروقات في أبعاد البيوض المتكيّسة تبعاً لأنواع البوغيات الخفية (الجدول 2–2) إلا أن هذه الفروقات صعبة التحديد جداً وصغيرة ولا يعتمد عليها في تحديد أنواع هذا الطفيلي عند استخدام المجهر الضوئي العادي، لأن قوة التكبير القصوى التي يملكها المجهر الضوئي (1000 مرة تقريباً) لا تمكن من

الحصول على بيانات دقيقة تؤكد التشخيص (عند استخدام عدسة القياس العينية المدرجة)، كما أن قياسات البيوض المتكيّسة تتغير بعد معاملتها بالصبغات والمحاليل المختلفة اللازمة للتلوين(Fall et al., 2003).

الجدول 2-2: قياسات (أبعاد) البيوض المتكيّسة عند بعض أنواع البوغيات الخفية (Smith, 2008)

الأنواع Species	أبعاد البيضة المتكيّسة (بالمكرون) Oocyst Dimensions (µm)
البوغة الخفية البشرية *C. hominis*	4.5X5.5
البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum*	4.5 X5.5
البوغة الخفية الرومية *C. meleagridis*	4.5–4.0 X 4.6–5.2
البوغة الخفية الأندرسونية *C. andersoni*	5.6 X7.4 (5.0–6.5 X8.1–6.0)
البوغة الخفية الفأرية *C. muris*	5.5 X7.4
البوغة الخفية البقرية *C. bovis*	4.17–4.76 X 4.76–5.35
البوغة الخفية الخنزيرية *C. suis*	4.4 X 5.05
البوغة الخفية القطية *C. felis*	4.5X5.0
البوغة الخفية الكلبية *C. canis*	3.68–5.88 X 3.68–5.88
البوغة الخفية البيلية *C. baileyi*	4.6 X 6.2
البوغة الخفية الدجاجية *C. galli*	6.2–6.4X8.0–8.5

2-6-2-التشخيص المصلي والمناعي: Serological and Immunological Diagnosis

يعتمد التشخيص المصلي والمناعي على كشف العوامل المناعية وتفاعل الأضداد مع مستضدات الطفيلي، ويتوفر العديد من العتائد التجارية التي تستخدم للكشف عن الاصابة بالبوغيات الخفية، ويستهدف بعضها مستضدات البيوض المتكيّسة في حين يكون الكشف عن الأضداد المتولدة بعد الخمج هدف بعضها الآخر.

وتستخدم المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم ELISA غالباً عند إجراء المسوحات والدراسات الوبائية ولأعداد كبيرة من العينات بهدف معرفة الأفراد الذين تعرضوا للإصابة بهذا الطفيلي، وتم تطوير عتائد تجارية تعتمد على مبدأ المقايسة المناعية الأنزيمية EIA يتم تطبيقها مباشرة على عينات البراز وتستهدف أحد المستضدات البرازية للبيوض المتكيّسة Coproantigen (Mohamed, 2014; Ryan et al., 2016).

وتعد حالياً طريقة المقايسة المناعية الإستشرابية السريعة Rapid immunochromatographic assay إحدى أسرع وأكثر الطرائق انتشاراً وبتكلفة مقبولة وتتمتع بحساسيةٍ sensitivity ونوعيةٍ Specificity عاليتين بالإضافة إلى سرعة انجاز الاختبار. وهي تعتمد على أضداد وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies خاصة بالمستضدات السطحية للبيوض المتكيّسة، وقادرة على كشف الإصابة عند وجود حوالي 100 بيضة متكيسة/ ميللي لتر من ناتج الاسهال كحد أدنى وبنوعية تراوحت وفق الدراسات بين 80 و 100% (Cheun et al., 2013; Smith, 2008)، ولكن يعاب على العتائد التجارية المتوفرة حالياً أنها مصنعة لكشف المستضدات الخاصة بالبوغة الخفية الصغيرة والبوغة الخفية البشرية، ولم تعرف دقتها تماماً بالنسبة لباقي الأنواع أو أنها كانت أقل من تلك التي تتمتع بها تجاه النوعين السابقين (Agnamey et al., 2011; Robinson et al., 2010)، وسجلت إحدى الدراسات التي اعتمدت على إحدى العتائد التجارية أن طريقة المقايسة المناعية الاستشرابية السريعة كانت فعالة وتمتعت بنوعية وحساسية عاليتين لدى استخدامها عند الأبقار والعجول وكشفت عن جميع الأنواع التي تصيبها على الرغم من أنها مصنعة تجاه مستضدات البوغة الخفية الصغيرة (Helmy et al., 2013).

وقد تمَّ مؤخراً تطوير وسائل استشعار حيوية (بيولوجية) Biosensor methods إلكترونية للكشف عن البيوض المتكيّسة في الماء أو في البراز، وتستخدم فيها أضداد IgM معدلة ومرتبطة برقاقات chips خاصة، وتستطيع هذه الطريقة إعطاء نتائج كمية تقدر أعداد الطفيلي وازديادها مع الزمن وفي الوقت الحقيقي real-time (Campbell and Mutharasan, 2008; Kang et al., 2008).

2-6-3- الطرائق الجزيئية والتنميط الجيني: Molecular Methods and Genotyping

ذكر في المراجع ذات الصلة العديد من التقانات الجزيئية المعتمدة في معظمها على تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)-based techniques والتي تكشف الحمض النووي للبوغيات الخفية وتستخدم في تشخيص الاصابة وتحديد الأنواع، ومنها RAPD-PCR ، وMultiplex PCR وNested-PCR (المعشش)، وتفاعل البوليميراز المتسلسل ذي الوقت الحقيقي Real-time PCR، وسلسلة الـ DNA وغيرها من التقانات.

(Chalmers and Katzer, 2013; Hajdusek et al., 2004; Mary et al., 2013; Ryan et al., 2016; Santin and Zarlenga, 2009)

وتتمتع هذه التقانات بنوعية وحساسية عاليتين مقارنة بالطرائق التشخيصية الأخرى، ويمكن استخدامها لكشف البيوض المتكيّسة في العينات البيئية كالماء وفي براز وروث الإنسان والحيوان، وطُوِّرَت تقانة

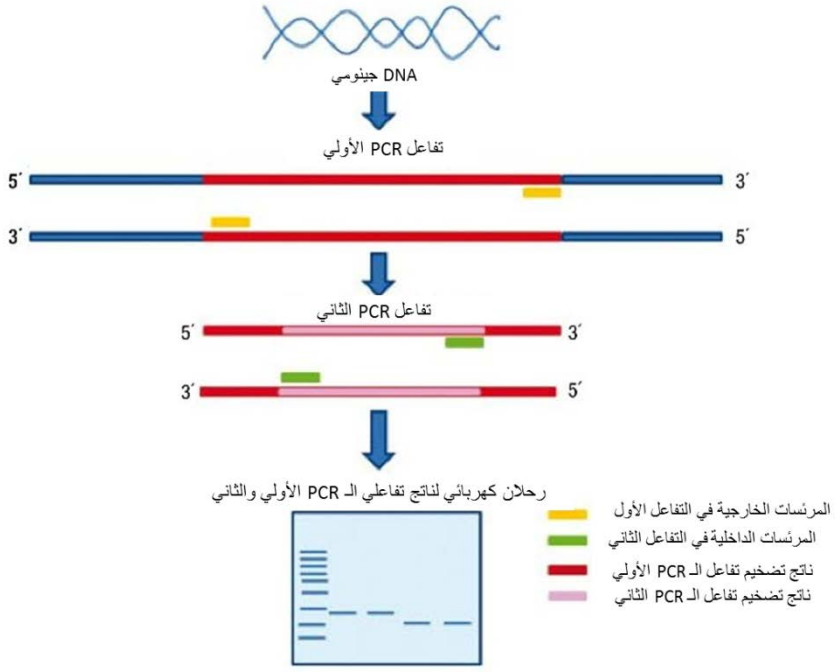
Real-time PCR بحيث تُقدِّر أعداد البيوض المتكيّسة في عينات الماء أو البراز وبنوعية وصلت إلى 100% وحساسية وصلت إلى 200 بيضة متكيسة في غرام البراز (انطلاقاً من بيضتين متكيستين في تفاعل الـ PCR الواحد) (Hadfield et al., 2011).

حددت الأوراق العلمية العديد من الجينات والمواقع المورثية في DNA الطفيلي التي يمكن أن تكون هدفاً لتفاعل البوليميراز المتسلسل كان أهمها 18S rRNA، و GP60 KDa، و HSP70، و COWP (يمكن معرفة الدلالات لهذه الاحرف في دليل الاختصارات)، وتعد المورثة المسؤولة عن الـ RNA الريبوزومي 18S أكثر تلك المورثات وروداً واستخداماً في الأبحاث التي تستهدف الكشف عن البوغيات الخفية وتحديد أنواعها، وذكرت إحدى المقالات الهامة أنه خلال أعوام 2008 و2009 و 2010 استخدمت هذه المورثة SSU rRNA (18S) في 100 بحث من أصل 116 بحثاً على مستوى العالم هدفت إلى تنميط هذا الطفيلي جينياً أي ما نسبته 86% من مجمل الأبحاث، تلته مورثة جدار البيضة المتكيّسة للبوغيات COWP في الترتيب (Xiao, 2010).

إن الأمر المهم في طبيعة المورثة SSU rRNA (18S) هو احتواؤها عدة مناطق محافظة Conserved ضمن الجنس عموماً بالإضافة إلى مناطق مفرطة التغاير Hyper-variable مما يساعد على تصميم مرئسات (مشارع) Primers في المناطق المحافظة لكشف الجنس والاستفادة من المناطق المتغيرة للتمييز بين الأنواع، كما أن هذه المورثة يوجد منها عدة نسخ Multiple copies ضمن الجينوم الواحد للطفيلي (Helmy et al., 2013; Xiao, 2010).

بعد استخلاص الـ DNA الجينومي للطفيلي يتم عادة تطبيق تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش Nested-PCR على المورثة SSU rRNA وذلك لزيادة حساسية ونوعية الاختبار وباستخدام زوجين مختلفين من المرئسات، زوج أولي Primary (خارجي External) يستخدم في تفاعل التضخيم الأول وزوج ثاني (داخلي Internal) يستخدم في تفاعل التضخيم الثاني Secondary (الشكل 2-8)، وينجز بعدها تحليل تعدد أشكال أطوال الشدف المقتطعة Restriction Fragment Length Polymorphism /RFLP/ على ناتج الـ PCR الثاني النهائي بهدف تحديد الأنواع أو الأنماط الجينية، إذ يُقطَّع ناتج التضخيم باستعمال إنزيمات قطع للـDNA تسمى إنزيمات النكلياز الداخلية Endonucleases (إنزيمات تقييد Restriction enzymes)، وترحل نواتج التقطيع كهربائياً Electrophoresis وتدرس الشاكلات Profiles الملاحظة بعد الترحيل لمعرفة الأنواع تبعاً لعدد القطع وأطوالها. ولابد من القول هنا أن الطرائق الجزيئية هي طريق إجباري لابديل عنه لتحديد الأنواع المعزولة من مختلف المصادر ولا يمكن الاستعاضة عنه عند البوغيات الخفية بأي طريقة أخرى تعتمد على الصفات الشكلية (Helmy et al., 2013; Smith, 2008; Xiao, 2010; Xiao et al., 1999a).

وبقدر مماثل لأهمية معرفة الأنواع والأنماط الجينية، فإن تحديد تحت الأنماط Subtyping يعدُّ أمراً بالغ الأهمية عند البوغة الخفية الصغيرة والبوغة الخفية البشرية، إذ وجد ارتباط بين تحت النمط وامكانية انتقال الطفيلي بين الإنسان والحيوان، فاقتصرت الإصابة في بعض تحت الأنماط عند البوغة الخفية الصغيرة على الإنسان في حين استطاعت أخرى أن تصيب الإنسان والحيوان، وبالتالي يمكن أن يُسهم هذا الفهم في معرفة مصدر الإصابة أو الجائحات في حال حصولها.



الشكل 2-8: توضيح لمبدأ تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش Nested-PCR
http://procesossanitarios1816.blogspot.com/p/tipos-pcr.html

ويشار هنا إلى أنه يُعتَمَدُ على المورثة المسؤولة عن البروتين GP60 (بروتين سكري في جدار الحيوان البوغي والأقسومات وزنه 60 كيلو دالتون) في تحديد تحت الأنماط، حيث يتم تضخيم تسلسل محدد منها وفق تفاعل Nested-PCR وباستخدام مرئسات خاصة، وتنجز سلسلة ناتج التفاعل الثاني ودراسته ومقارنته مع البيانات المتوفرة سابقاً لتحديد تحت النمط.

تم تقسيم تحت الأنماط عند البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* بناء على سلسلة المورثة gp60 إلى عشر عائلات أساسية وهي: (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIf, IIh, Iii, IIj, IIk)، والبوغة الخفية البشرية *C. hominis* إلى ست عائلات هي: (Ia, Ib, Id, Ie, If, Ig)، والأحرف السابقة الدالة تكتب عادة في بداية اسم تحت النمط كبادئة له Perfix .

يحتوي أيضاً تسلسل المورثة gp60 في الطرف `5 على تكرارات ثلاثية بأعداد مختلفة تبعاً لتحت النمط المدروس وتساعد في التنميط أيضاً، هذه التكرارات الثلاثية هي الكودونات Codons الثلاثة المرمزة للحمض الأميني السيرين Serine وتشمل : TCG,TCT,TCA ، ويكتب في اسم تحت النمط بعد البادئة الخاصة بالعائلة أعداد كل ثلاثية من الكودونات السابقة مرمزاً بالنكليوتيد الأخير فقط أي يرمز للكودون (راموز) TCA مثلاً بالحرف A فقط، فيشير اسم تحت النمط **Ib A10G2** على أنه أحد تحت أنماط البوغة الخفية البشرية يتبع للعائلة Ib ويمتلك عشر نسخ من الثلاثية TCA ونسختين من الثلاثية TCG .

لوحظ أيضاً في بعض العائلات تحت النمطية (IIa مثلاً) وجود تسلسلات نكليوتيدية تأتي بعد منطقة التكرارات الثلاثية الطرفية وتم ترميز هذه التسلسلات بـ ..R1,R2, ويضاف هذا الرمز إلى الاسم في آخره. (Abu samra, 2013; Mohamed, 2014; Xiao, 2010).

لم تدرس تحت الأنماط عند باقي أنواع البوغيات الخفية واقتصرت عملية التنميط على تحديد الأنواع، ما عدا استثناءات قليلة كالبوغة الرومية التي سجلت الدراسات وجود تحت نمطين منها(Glaberman et al., 2001).

2-7- الإكثار في حيوانات التجارب وأجنة الدجاج:

Propagation in Laboratory Animals and Chicken Embryo

تعتمد الأبحاث التي تهدف إلى فهم الطفيلي ودراسة إمراضيته ورد الفعل المناعي الحاصل نتيجة الخمج به وتجريب وتقييم الأدوية واللقاحات على حيوانات التجارب بشكل أساسي، وتمثل العجول الحيوان الأهم في هذا المجال لاسيما بالنسبة للبوغة الخفية الصغيرة، حيث تمكَّن الباحثون من الحصول على أعداد هائلة من البيوض المتكيّسة وصلت إلى (10^7x4 /غرام روث) الأمر الذي يسهل ويساعد على إجراء الدراسات المناعية والجزيئية وغيرها. ولكن يصعب على بعض المراكز البحثية توفير وتهيئة المكان واللوازم الضرورية لتربية العجول، مما جعل العلماء يبحثون عن بدائل أخرى كان من أهمها الفئران الرضيعة أو المكبوحة مناعياً، والهمستر، والأرانب، وحتى أجنة بيض الدجاج والمزارع الخلوية والأوساط الزرعية المختلفة (Gasser and O'Donoghue, 1999; Rossi et al., 1990).

تتكاثر البوغة الخفية الصغيرة بشكل جيد في فئران التجارب وفي معظم السلالات المعروفة منها، وغالباً ما يتم ذلك تجريبياً في الفئران الرضيعة حديثة الولادة، أو في فئرانٍ بالغةٍ ناقصة المناعة، حيث يتم كبت المناعة بعدة طرائق منها إعطاء المركبات الكورتيزونية أو بتعريض الحيوانات للإشعاعات (كالأشعة السينية بجرعات عالية) أو أن تكون منزوعة الغدة الصعترية Athymia، وانتجت سلالات منها تعاني من خلل وراثي مناعي دائم يسمى بالعوز المناعي المشترك الشديد SCID حيث تستخدم هذه السلالات في كثير من الحالات لدراسة تطور المرض الذي غالباً ما يكون مزمناً عندها بما يشابه الاصابات البشرية عند الأشخاص ناقصي المناعة (Certad et al., 2010a; Nagano-Koyashiki et al., 2013; Rasmussen and Healey, 1992).

تعد الخنانيص Piglets الحيوانات المفضلة لإكثار البوغة الخفية البشرية على الرغم من إمكانية إكثارها في اليربوع (غالباً المثبط مناعياً) وحتى في العجول، ولكن احتمالية تلوث واختلاط العينة بالبوغة الخفية الصغيرة يجعل من الخنانيص الحيوانات المفضلة لهذه الغاية (Widmer and Tzipori, 2008).

من المعروف أن حيوان الهمستر من الحيوانات الهامة مخبرياً لسهولة التعامل معه وتربيته وحتى دراسته، ولكن الدراسات التي اختبرت قابليته للإصابة بأنواع البوغيات الخفية قليلة جداً وقديمة، والأنواع التي تم الإخماج بها لم تنمط على أساسٍ جزيئي دقيق مما يقلل من أهمية نتائج تلك الدراسات. ولم يوجد في الأدبيات السابقة سوى مقالتين علميتين (Kim, 1987; Rossi et al., 1990) درستا إمكانية إصابة الهمستر بأنواع (مجهولة) معزولة من العجول، إذ تم في إحداها نقل الاصابة إلى همسترات بالغة مثبطة مناعياً باستخدام المركبات الكورتيزونية بالمشاركة مع التعرض للأشعة السينية، في حين تم في الأخرى إصابة صغار الهمستر الرضيعة خلال الأيام الأولى من العمر، ودلت التجربتان على امكانية استخدام الهمستر كنمط حيواني للإكثار والحفاظ على البوغة الخفية.

وكما هو الحال عند الهمستر كذلك عند الأرانب، حيث أنجزت بعض الدراسات القديمة (القليلة أيضاً) والتي هدفت إلى إكثار أنواع مختلفة من البوغيات الخفية في الأرانب، واستطاعت إحدى تلك الدراسات إكثار نوعٍ من البوغيات الخفية عزلت من إنسان مصاب في أرانب كانت بعمر 4–5 أسابيع (بعد فطامها)، وفي دراسة ثانية تباينت النتائج عند إخماج أرانب حديثة الولادة وأخرى بالغة بالبوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* المعزولة من عجول مصابة، إذ لم تتسبب الإصابة بأية أعراض عند الحيوانات البالغة ولم تلاحظ في برازها إلا أعدادٌ قليلة جداً من البيوض المتكيّسة، في حين أدت إلى أعراض وتغيرات مرضية واضحة عند الأرانب الرضيعة حديثة الولادة Neonatal (Hernandez et al., 1994; Mosier et al., 1997).

يمكن أن تتباين نتائج إكثار نوع ما من البوغيات الخفية في أحد حيوانات التجارب مما يشير إلى وجود عوامل عديدة تؤثر في هذا الأمر تتعلق بالعزولة وتحت النمط، ومن هذه الأمثلة نذكر البوغة الخفية

الأندرسونية *C. andersoni* التي فشلت في التكاثر لدي الفئران السليمة والناقصة مناعياً وفي جميع الدراسات التي أنجزت حول العالم عدا عترة واحدة في اليابان استطاعت التكاثر عند فئران عانت من العوز المناعي المشترك الشديد SCID (Masuno et al., 2013; Nagano-Koyashiki et al., 2013).

يتم إكثار أنواع البوغة الخفية التي تصيب الدجاج وخاصة البوغة الخفية البيلية *C. baileyi* إما في الصيصان بعمر أقل من 10 أيام أو في أجنة الدجاج Chicken embryo، حيث تحقن البيوض المخصبة بين اليوم العاشر والثاني عشر بعد الحضن ضمن الكيس السقائي المشيمائي chorioallantoic sac، ويمكن إحداث الخمج في الصيصان بعدة طرائق وهي عبر الفم وعبر الحقن الرغامي أو عبر المجمع، وذكرت إحدى الدراسات أن الأعداد التي يتم الحصول عليها نتيجة الإكثار في صوص واحد تعادل الأعداد المجموعة من بيضتين مخصبتين إلا أن الإكثار في البيض المخصب أسهل وأكثر عقامة عند عزل وتنقية البيوض المتكيّسة (Blagburn et al., 1987; Wunderlin et al., 1997).

هذا ولابد من الاشارة إلى أن البوغة الخفية الصغيرة يمكن أن تنمو وتتكاثر ضمن أجنة الدجاج على الغشاء السقائي المشيمائي CAM، ولكن اختلفت نتائج التجارب المنجزة حول هذه النقطة، ففي بعض الحالات تم الحصول عل أعداد جيدة بعد الإكثار في البيض المخصب، وفي أحيان أخرى لم تكن الأعداد المجموعة مرضية على الإطلاق (Arrowood, 2002, 2008).

2-8-الوقاية والعلاج: Prophylaxis and Treatment

2-8-1- الوقاية: Prophylaxis

أصبح من المعروف أن طريقة الخمج بالبوغيات الخفية تتم عبر ابتلاع أو استنشاق البيوض المتكيّسة المتبوغة لهذا الطفيلي، وباعتبار أنه إلى الآن لا يوجد علاج فعال بشكل كامل ومرضٍ، فإن الوقاية منه ومنع انتشار البيوض المتكيّسة في البيئة المحيطة ووصولها إلى الغذاء ومصادر الماء تعد النقطة الأساس في السيطرة والتحكم على هذا المسبب المرضي.

ومن الأمور الهامة للحد ومنع انتشار الاصابة هي تطبيق كافة الإجراءات الصحية والنظافة الكفيلة بتقليص حالات انتقال الاصابة من شخص أو حيوان لآخر، وفي الحظائر يجب التأكد من نظافة الأدوات المستعملة في التغذية وإرضاع العجول وتعقيمها بعد كل استخدام، والعمل على تنظيف وتطهير الحظائر ومرابط وصناديق (بوكسات) العجول، وعزل العجول المصابة بالإسهال عن باقي أفراد القطيع بأسرع ما يمكن، كما أن فصل العجول حديثة الولادة عن أمهاتها بعد الولادة يساهم في تقليل تعرض العجول للمسببات المرضية المختلفة. ومن المهم التشديد على نظافة العمال والقائمين على رعاية العجول، وعدم تنقلهم بين حظائر

الأبقار وبين العجول المصابة والعجول السليمة، ولابد من التأكيد على تناول السرسوب (اللبأ) بعد الولادة مباشرة وبكميات مناسبة وكافية، وعلى تأمين مصادر مياه نظيفة وخالية من البيوض المتكيّسة أو معالجة المياه بالطرق الفعالة (Mohamed, 2014; Nakamura and Meireles, 2015; Stockdale et al., 2008).

تؤثر العوامل الفيزيائية المختلفة على البيوض المتكيّسة للبوغة الخفية، ومنها السخونة والبرودة والضغط والجفاف Desiccation والإشعاعات، حيث لوحظ أن تعرضها لدرجة حرارة 64.2 C° لمدة خمس دقائق أو 72.4 C° لمدة دقيقة أفقدها قدرتها الإخماجية، واستطاعت البيوض المتكيّسة البقيا Survive بعد تجميدها عند درجة −20C° ولفترة طويلة ولكنها لم تقاوم التجميد عند درجة −70 C° وحتى عند إضافة مضادات التجمد Cryoprotectants (Fayer, 1994). كما جعلت الأشعة فوق البنفسجية البيوض المتكيّسة غير خامجة، ومن بين المطهرات المتوفرة تجارياً كانت تلك التي تحتوي على الماء الأوكسجيني (فوق أكسيد الهيدروجين) وعلى ثنائي أكسيد الكلور وعلى الأمونيا الأفضل والأقوى تأثيراً.

وعلى الرغم من أن المطهرات التي تحتوي على البروم والكلور واليود استطاعت إضعاف القدرة الإخماجية للطفيلي إلا أن التراكيز العالية والفترة الطويلة المطلوبة للتماس معها لتحقيق هذه الغاية جعل استخدامها غير عملي على أرض الواقع. ويتمتع غاز الأوزون Ozone بتأثير ممتاز كمطهر تجاه البيوض المتكيّسة للبوغيات الخفية مما يجعل استخدامه أحدَ أهم التقنيات الواجب اللجوء إليها في تعقيم المياه للتخلص من طفيلي البوغة الخفية (Stockdale et al., 2008).

أُنجزت عدة أبحاث هدفت إلى إنتاج لقاحات عبر إحداث الخمج ببيوض متكيّسة مضعّفة بتعريضها للأشعة (التشعيع) أو بتقانات الهندسة الوراثية Genetic engineering ، ولكن لا يوجد إلى الآن لقاح متوفر تجارياً أو مُصرّح باستخدامه (Ryan and Hijjawi, 2015)

2-8-2-العلاج: Treatment

دُرِسَ كثيرٌ من المركبات الدوائية بهدف استخدامها في علاج داء البوغيات الخفية لكن القليل منها أبدى بعض الفعالية وسُمِحَ باستخدامه.

إن الدواء الوحيد المصرح باستخدامه عند الإنسان وفق الـ FDA (Food and Drug Administration) هو النيتازوكسانايد Nitazoxanide وقد أعطى فعالية مقبولة عند الأشخاص الأسوياء مناعياً، في حين لم تكن فعاليته ملاحظة عند ناقصي المناعة أو عند الأطفال الذين يعانون من سوء التغذية Malnourished (Ryan and Hijjawi, 2015; Ryan et al., 2016).

عند الحيوانات، سواء الأبقار أم الدجاج، فإن مركب الهالوفوجينون Halofuginone هو الدواء الأهم المستخدم في الوقاية والعلاج عند الإصابة بالبوغيات الخفية، ويعطى عادة للوقاية وخاصة في الأيام الأولى من العمر عند العجول أو خلال بداية الإصابة وظهور الأعراض، ويجب الانتباه إلى أن سميّة هذا المركب عالية إذ تظهر علامات وأعراض التسمم به عند مضاعفة جرعته الصغيرة نسبياً (عند العجول 100 ميكرو غرام/الكيلوغرام من الوزن الحي)، وتكون أعراض التسمم Symptoms of poisoning عند العجول الرضيعة على شكل إسهال ودم في الروث وتجفاف Dehydration وفتور Apathy وإرهاق Exhaustion (Nakamura and Meireles, 2015; Silverlas et al., 2009).

إن الفهم الحقيقي لبيولوجيا هذا الطفيلي وبنيته وطريقة تغذيته وتكاثره، يقدم لنا الجواب والتفسير العلمي لمقاومة البوغيات الخفية لمعظم الأدوية المضادة للأكريات Anticoccidial drugs والأوالي الأخرى.
ومن هذه الأمور عدم وجود الصانعات الخاصة بمعقدات القمة (ذات الدور الاستقلابي) Apicoplast عند هذا الطفيلي وافتقاده لمتقدرات حقيقية وغياب دورة حمض الليمون Citrate cycle لديه وبالتالي افتقاده لإنزيمات السايتوكروم التنفسية Respiratory cytochrome مما يفقد الأدوية التي تستهدف هذه المتعضيات الداخلية أو التي تعطل عمل وآلية الإنزيمات الاستقلابية قدرتها وفعاليتها ضد البوغيات الخفية.
كما أن توضع متقسمات وعرسيات هذا الطفيلي تحت غشاء الخلية المصابة وبشكل منفصل تماماً عن هيولاها يحميها من الأدوية التي تدخل وتتركز في الهيولى وداخل الخلية (Ryan et al., 2016).

وفي دراسة حديثة هدفت إلى تجربة فكرة وطريقة جديدة للعلاج والوقاية من البوغيات الخفية، تمَّ إعطاء العجول الرضيعة أضداداً مبيدةً بيولوجياً Biocide-Antibodies مع بدائل الحليب بشكل متزامن مع إحداث خمجٍ بالبوغة الخفية الصغيرة خلال اليومين الأولين بعد الولادة، وأظهرت هذه الدراسة نتائج واعدة، إذ أدت إلى التخفيف من أعراض المرض وحدوث تحسن كبير عند العجول المعالجة مقارنة مع الشاهد، بالإضافة إلى انخفاض أعداد البيوض المتكيّسة المطروحة. ولابد هنا من التوضيح أن هذه الأضداد هي عبارة عن اندماج أضداد وحيدة نسيلة خاصة بالبوغيات الخفية مع ببتيدات مُمَزِّقة للأغشية Membrane-disruptive peptides (مبيد حيوي Biocide) (Imboden et al., 2012).

وتجدر الإشارة إلى أن طرائق العلاج لحالات الإسهال تتشابه بشكل كبير وبغض النظر عن المسبب، وتركز جميعها على تعويض السوائل وتعديل حالة التجفاف Dehydration، والحمّاض Acidosis وفقدان

الكهارل (الشوارد) الناجمة عن ضعف الامتصاص Malabsorption وزيادة الإفراز Hypersecretion من الأمعاء (Costello, 2011).

2-9-البوغيات الخفية في سورية: *Cryptosporidium* in Syria

شُخِّصت البوغيات الخفية لأول مرة في سورية عام 1991 وكان ذلك في ثماني حالات عند الإنسان وتم الإعلان عنها من قبل د.محمد طاهر اسماعيل في المؤتمر الثامن لأمراض جهاز الهضم 1992، وذَكَرَتْ أول مقالة علمية حول داء البوغيات الخفية في سورية عند المرضى الذين عانوا من اسهالات مزمنة، وقد بلغت نسبة الإصابة حينها 22.6% (Ismail, 1995).

وأُنجزت بعد ذلك عدة أعمال هدفت إلى التحرّي والكشف عن البوغيات الخفية عند البالغين وعند الأطفال (الأديب،1999 ; الكسار،1999) وكانت النسب المسجلة 18.64% عند البالغين الذين عانوا من إسهالات مزمنة، و 24.09% عند الأطفال الذين عانوا من إسهالات مزمنة، وفي أحدث دراسة أنجزت حول البوغيات الخفية (ابراهيم، 2016) كانت النسبة المسجلة أقل من تلك المسجلة في الأعمال السابقة.

وتعَدُّ دراسة (قطرنجي، 1997) الأولى عند الحيوانات في سورية، وأظهرت نتائجها أن نسبة الإصابة كانت 47.7% عند العجول الرضيعة المصابة بالإسهال، و14.47% عند تلك السليمة ظاهرياً.

أما عند الدجاج فقد ذَكرَ أول تقرير أُنجز من قبل (الوسوف، 2008) أن نسبة الإصابة في 70 قطيعاً (من الدجاج البياض وأمات دجاج اللحم ودجاج اللحم) بلغت 38.24% (24 قطيعاً)، علماً أن التشخيص اعتمد على رؤية الطفيلي في مقاطع نسيجية لعينات أخذت من جراب فابريشيوس ورغامى وقصبات وأمعاء طيور مشتبهة.

ومؤخراً وجدت دراسة (درويش، 2016) أن نسبة الإصابة في قطعان دجاج اللحم في سورية كانت 4.89%، في حين كانت نسبة الاصابة عند الأغنام المصابة بالإسهال 20.52% و 3.44% لدى الأغنام السليمة ظاهرياً (طبش، 2016)، وكانت نسبة الاصابة مرتبطة بالعمر إذ لوحظت أعلى نسب الإصابة عند الحملان بعمر أقل من شهرين.

-الفصل الثالث-

مواد البحث وطرائقه

Materials and Methods

3-مواد البحث وطرائقه Materials and Methods

تَمَّ في هذا العمل جمع عينات من ثلاثة مصادر شملت الإنسان والأبقار والدجاج بهدف كشف الإصابة بالبوغيات الخفية باستخدام طريقة التلوين الصامدة للحمض لكينيون، حيث صبغت وفحصت في البداية لطاخات حضرت مباشرة من عينة البراز أو الزرق، ولطاخات أخرى بعد تطبيق طريقة الفورمول-إيتر التركيزية لزيادة الحساسية والدقة في الكشف عن الاصابات. **استخلص بعد ذلك الـ DNA من البيوض المتكيّسة الموجودة في العينات المصابة** وأجري على المستخلص تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش Nested-PCR وأُتبع بتحليل تعدد أشكال أطوال الشدف المقتطعة RFLP بهدف تحديد الأنواع المشخصة.
كما تم تنقية البيوض المتكيّسة لأهم الأنواع المشخصة وهو البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* من إحدى العينات التي تمّ جمعها من العجول الرضيعة ودرست قدرتها على إحداث الخمج والتكاثر عند الهمستر والأرانب وفي أجنة الدجاج.

3-1- جمع العينات وفحصها: Samples Collection and Examination

3-1-1- جمع العينات: Samples Collection

تضمَّن هذا العمل فحص 437 عينة من البراز والروث والزرق جُمعت في الفترة الممتدة بين شهر تشرين أول لعام 2012 و حزيران لعام 2015، وذلك من أطفال دون الخامسة من العمر، ومن عجول رضيعة (أقل من شهرين)، ومن أبقار بالغة، بالإضافة إلى عينات أخرى تمَّ الحصول عليها من مزارع فروج اللحم (الجدول 3-1).
عانت جميع العجول الرضيعة المستهدفة في هذه الدراسة وكذلك الأطفال من الإسهال، أما الأبقار البالغة فقد كانت سليمة ظاهرياً، بينما أظهرت قطعان دجاج اللحم غالباً أعراضاً تنفسيّة أو أعراضاً هضميّة أو كليهما.
جمعت العينات البشرية من محافظتي دمشق وحماة، في حين كانت محافظتا حماة وحمص مصدراً للعينات البقرية (العجول الرضيعة والأبقار البالغة)، ومحافظات حماة وحمص وحلب وطرطوس وريف دمشق مصدراً للعينات المأخوذة من مزارع دجاج اللحم.
وضعت العينات في عبوات بلاستيكية محكمة الإغلاق وسُجِّلت على كل عبوة البيانات الخاصة بها، وأُضيف إلى تلك المجموعة من العجول الرضيعة والأبقار حجمٌ مماثل من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم Potassium dichromate بتركيز 2.5% (Abu samra, 2013)، أما عيّنات إسهال الأطفال فقد مزجت بحجم مماثل من الفورمالين بتركيز 10%. في حين تم التعامل مع كل مزرعة من مزارع الدجاج كعينة واحدة

إذ تم تجميع زرق طازج لـ4–5 طيور معاً في عبوة واحدة وأُضيف لها حجم مماثل من ثنائي كرومات البوتاسيوم بتركيز 2.5%. وحفظت جميع العينات بغض النظر عن مصدرها عند الدرجة +4 C° إلى حين فحصها.

الجدول 3–1 : عينات الدراسة موزعة تبعاً لأثويائها والمحافظة التي جمعت منها في سورية

المحافظة	دجاج اللحم	أطفال (<5سنوات)	مصدر بقري	
			أبقار بالغة	عجول رضيعة
حماة	64	9	25	55
حمص	3	–	19	14
دمشق	–	204	–	–
ريف دمشق	6	–	–	–
طرطوس	30	–	–	–
حلب	8	–	–	–
المجموع	**111**	**213**	44	69
			113	

3–1–2– فحص العينات: Samples Examination

استخدمت صبغة كينيون الصامدة للحمض Kinyoun's acid fast stain لتشخيص الإصابة بالبوغيات الخفية، إذ غسل جزء صغير من العينة للتخلص من مادة ثنائي كرومات البوتاسيوم أو مادة الفورمالين اللتين قد تؤثران على جودة ووضوح الشريحة المحضرة بعد صباغتها، وتم الغسل بإضافة الماء المقطر والرج والمزج الجيد والتثفيل بقوة 1100 gx لمدة خمس دقائق وتم التخلص من السائل الطافي Supernatant وأعيدت العملية ثلاث مرات للتخلص من ثنائي كرومات البوتاسيوم أو الفورمالين بشكل جيد، وأخذت كمية 50 µl من الراسب المغسول وفرشت على شريحة زجاجية وأكملت إجراءات صبغة كينيون، واستخدمت صبغة أزرق الميثيلين كصبغة مباينة (مقابلة) Counter stain، ثمَّ فحصت كامل اللطاخة المحضرة تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية الغاطسة، حيث تبدو البوغة الخفية بعد الصباغة في حال وجودها دائرية إلى بيضية الشكل بلون وردي أو أحمر محاطة بمحيط أزرق .

تمَّ بعد ذلك تطبيق طريقة الفورمول–إيتر التركيزية على جميع العينات السلبية نتيجةً لفحصها باللطاخة السابقة بهدف تأكيد النتيجة إذ أن حساسية هذه الطريقة التركيزية أعلى وبدرجة كبيرة من طريقة اللطاخة المباشرة.

كما حضرت لطاخات مباشرة رطبة ملونة بمحلول لوغول من العينات البشرية فقط (إسهال الأطفال) بهدف تحرّي وجود أنواع أخرى من الطفيليات الأوالي.

3–1–2–1– صبغة كينيون الصامدة للحمض: Kinyoun's Acid Fast Stain

تستغل هذه الطريقة البنية الكتيمة لجدار البيضة المتكيّسة للبوغة الخفية تجاه معظم الصبغات ومزيلات اللون الحامضية، إذ يستخدم في طريقة كينيون ملون الفوكسين الكاربولي Carbol-fuchsin القوي والقادر على اختراق جدار البيضة المتكيّسة بفضل مادة الفينول الداخلة في تركيبه، يلي ذلك تطبيق إحدى مزيلات اللون الحامضية (كالكحول الحامضي أو أحد الأحماض) الذي لا يستطيع إزالة اللون من الطفيلي على عكس باقي مكونات اللطاخة المحضرة.

3–1–2–1–1– طريقة إنجاز صبغة كينيون: Kinyoun Staining Procedure

تمَّ إنجاز الصباغة وفق الآتي:(Chaskes and Austin, 2008)

– تمّ تحضير لطاخة على شريحة زجاجية وتركت حتى جفافها بشكل كامل.

– ثُبّتت اللطاخة بغمسها في الكحول الميتيلي المطلق لمدة 10 دقائق أخرجت بعدها وتركت حتى جفافها.

– غُمست في صبغة الفوكسين الكاربولي Carbol-fuchsin لمدة 3 دقائق.

– أُخرجت الشريحة من الصبغة وغسلت بالماء.

– تَمَّت إزالة اللون باستخدام الكحول الحامضي Acid alcohol 3% وذلك بسكبه على اللطاخة والانتظار لـ10 ثوانٍ وغسلها بالماء بعدها، و أعيدت هذه العملية حتى زوال اللون بشكل كامل.

– غُطّيت اللطاخة بصبغة أزرق الميتيلين (الصبغة المباينة) لمدة 2 دقيقة.

– غُسلت الشريحة بعدها بالماء وفحصت باستخدام العدسة الزيتية.

3-1-2-1-2- الكواشف المستخدمة في صبغة كينيون: Kinyoun Staining Reagents

(Chaskes and Austin, 2008)

- صبغة الفوكسين الكاربولي Carbol-fuchsin: حُلَّت كمية 40 g من الفوكسين القاعدي Basic fuchsin في 200 ml من الكحول الإيتيلي بتركيز 95%، وأضيف بعد ذلك 1000ml من الماء المقطر و 80 g من الفينول المسال (المصهور) Liquefid phenol .

- مزيل اللون Decolorizer: أضيف 30 ml من حمض كلور الماء المركز Concentrated hydrochloric acid إلى 970 ml من الكحول الإيتيلي 95% للحصول على الكحول الحامضي بتركيز 3%.

- الصبغة المباينة (المقابلة) Counterstain: تمَّ حل 3 g من بوردة أزرق الميتيلين Methylene blue في لترٍ من الماء المقطر للحصول على الصبغة المطلوبة بتركيز 0.3%.

3-1-2-2- طريقة الفورمول-إيتر التركيزية: Formol-Ether Concentration Method

طبقت هذه الطريقة على 1 ml من الراسب المغسول من ثنائي كرومات البوتاسيوم أو الفورمالين (كما ذكر آنفاً) ووفق الخطوات التالية (Smith, 2008) :

- وضع 1 ml من راسب العينة المغسولة في أنبوب وأضيف له 7 ml من الفورمالين تركيزه 10% وأغلق الأنبوب بإحكام وتم مزج المعلق بشكل جيد بالرج.

- مُرِّر المعلق بعد ذلك عبر مصفاة إلى أنبوب آخر زجاجي ذي نهاية مخروطية سعته 15 ml وأضيف إليه 3 ml من الإيتر (Diethyl ether) وأغلق باحكام بسدادة مطاطية وتم رج الأنبوب بقوة لمدة 30 ثانية مع قلب الأنبوب عدة مرات أثناء الرج.

- نزعت السدادة ببطء وبحذر لتحرير الضغط المتولد من تبخر بعض الإيتر الموجود داخل الأنبوب، وتم التثفيل بقوة gx1200 لمدة 2 دقيقة.

- لوحظ في الأنبوب بعد الثفيل تشكل عدة طبقات ، حيث شكَّل الإيتر طبقة علوية، تلته طبقة من الشوائب والدهون الموجودة في البراز ونواتج الإسهال، وبعدها طبقة الفورمالين، بالإضافة إلى الراسب الموجود في أسفل الأنبوب (الشكل 3-1).

- تم التخلص من جميع الطبقات والاحتفاظ بالراسب The sediment، وتم نقله كاملاً إلى شريحة زجاجية وحضرت منه لطاخة وجففت وثبتت بالكحول الميتيلي المطلق وصبغت بطريقة كينيون وفحصت كما ذكر آنفاً في الفقرة السابقة.

الشكل 3-1: الطبقات المتشكلة في الأنبوب بعد إنجاز طريقة الفورمول – إيتر التركيزية.

3-2- استخلاص الـDNA وتنميط العينات جينياً:

DNA Extraction and Samples Genotyping

أستُخلص DNA الطفيلي من **عينات البراز الإيجابية** والمغسولة ومن دون أية تنقية باستخدام عتيدة تجارية تعتمد على أعمدة خاصة تحتوي أغشية السيليكا Silica membrane التي تتميز بقدرتها على ربط الـDNA عند درجات pH محددة وتحريره عند أُخرى، تم بعد ذلك إنجاز تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش Nested-PCR وفحصت النواتج بالرحلان الكهربائي، وأتبع بتحليل RFLP باستخدام ثلاثة إنزيمات تقييد (*Ssp* I, *Vsp* I, *Mbo* II) طبقت على ناتج تفاعل الـPCR الثاني، ودرست شواكل Profiles التقطيع بعد ترحيلها على هلامة الأغاروز، وحددت الأنواع إثر ذلك وفق ما ذكر في المراجع.

3-2-1- استخلاص الـ DNA: DNA Extraction

أُستخدم لهذه الغاية عتيدة تجارية خاصة **NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany)** (الشكل 3-2)(Mary et al., 2013) حيث أخذت كمية 250-300 µl من العينة المغسولة من ثنائي كرومات البوتاسيوم أو الفورمالين وأضيف إليها ml1 من دارئة TE (10mM Tris ,1mM EDTA-Promega,USA) وذلك وفق التعديلات المذكورة في تعليمات الشركة المصنعة الخاصة بالعينات البرازية Stool samples، وتم المزج بالرج الشديد باستخدام جهاز Vortex لمدة 30 ثانية ومن ثم ثُقِلت العينة بقوة

gx4000 لمدة 15 دقيقة وتم التخلص من السائل العلوي، وطُبِّقَت على الراسب المراحل الموصى بها من الشركة المصنعة للعتيدة، باستثناء بعض التعديلات التي أجريت إذ حُضِّنَت العيّنة مع إنزيم البروتيناز ك Proteinase K ليلة كاملة على درجة حرارة 65 C° بدلاً من 56 C°، وتم أيضاً في نهاية الاستخلاص الحصول على الـ DNA من العينة محلولاً في 60 µl من دارئة الشطف Elution Buffer بدلاً من 100 µl وذلك لتركيز كمية الـDNA المستخلصة وحفظت عند الدرجة −20 C° إلى حين إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل.

الشكل 3−2: العتيدة المستخدمة في استخلاص الـDNA من عينات البراز

3−2−2− تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش: Nested-PCR

3−2−2−1− تفاعلات التضخيم: Amplification Reactions

أجري تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش Nested-PCR وباستخدام زوجين من المرئسات النوعية (مَشارع) Primers الخاصة بتسلسل الـ DNA المسؤول عن مورثة SSU rRNA (الرنا الريباسي الموجود في الوحيدة الصغيرة) وفق ما ورد في الكثير من أهم الأبحاث العلمية ذات الصلة منها (Feng et al., 2007; Helmy et al., 2013; Xiao et al., 1999a). وكان تسلسلا المرئسين المستخدمين في التفاعل الأولي primary PCR هما: XF1 (5´-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3´)

و

XR1 (5´-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3´) **(من شركة Alpha DNA,Canada)** حيث تكون مزيج التفاعل الأولي (50 µl) والذي يستهدف تضخيم قطعة بطول ≈ **1325 bp** مما يلي:

5 µl من مستخلص الـ DNA ، **1 µl** (10pmol/µl) لكل من تسلسلي المرئستين، **1 µl** (10mM) قواعد آزوتية dNTPs، **5 µl** (10x) دارئة الاختبار PCR Buffer، **4 µl** (25mM) كلوريد المغنيزيوم،

0.25 µl (5U/µl) إنزيم التاك **(Thermo,(EU) Lithuania) *Taq* DNA Polymerase**، وتم إكمال المزيج بماء مقطر معقم خالٍ من إنزيم الدناز DNase حتى 50 µl .

وتم التضخيم في جهاز المدور الحراري Thermal cycler وفق البرنامج التالي:

مرحلة التمسُّخ الأولي Initial denaturation 94˚ مئوية 2 دقيقة دورة واحدة // دورات التضخيم وعددها 35 على الشكل التالي: 94˚ مئوية 30 ثانية، 55˚ مئوية 30 ثانية، 72˚ مئوية 1 دقيقة// مرحلة الاستطالة النهائية Final extension 72˚ مئوية 7 دقائق دورة واحدة.

وتم استخدام مرئســات أخرى للتفاعل الثاني المعشش Secondary PCR بهدف تضخيم قطعة بطول ≈ **840** bp: XF2 (5´- GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3´) و XR2 (5´-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3´) **(من شركة Alpha DNA,Canada)** وبمزيج وبرنامج تضخيم مماثل لما ورد آنفاً ولكن تم الانطلاق من **5 µl** من ناتج التفاعل الأولي كمرصاف (قالب) Template في التفاعل الثاني.

واستخدمت عزولة من البوغة الخفية البيلية *Cryptosporidium baileyi* كشاهد إيجابي Positive control **(No:061005-Kyorin University School of Medicine, Mitaka, Tokyo, Japan)** في تفاعلات التضخيم، كما استخدم الماء المقطر منزوع الشوارد كشاهد سلبي.

3-2-2-2- الرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز: Agarose Gel Electrophoresis

حضرت في البداية دارئة الرحلان TAE (10X) كما ورد في (الجدول 3-1): (Sachse and Frey, 2003)

الجدول 3-1: مكونات محلول أم من دارئة الرحلان TAE (10X)

المادة	الكمية
Tris-Base	24.2gr
حمض الخل الثلجي Glacial **A**cetic Acid	5.7 ml
EDTA (محلول تركيزه 0.5 M و pH=8)	10 ml
ماء مقطر للوصول إلى الحجم النهائي	500 ml

ثم حُضِّرت هلامة الأغاروز بتركيز 1.5 %، وذلك بوزن كمية مناسبة من مسحوق الأغاروز تناسب الحجم النهائي المراد تحضيره (والذي يختلف باختلاف حجم قالب الهلامة وعدد الهلامات المراد تحضيرها) وحلت

في كمية من دارئة الـ TAE (1 X أو 0.5 X بحسب تعليمات جهاز الرحلان)، وسخن المزيج في فرن الأمواج المكروية (مايكرويف) حتى الذوبان التام لمسحوق الأغاروز.
ترك المزيج ليبرد حتى C°60 تقريباً، وأضيفت بعدها كمية مناسبة من بروماید الإيثيديوم Ethidium Bromid بوساطة ماصة مكروية ليصبح التركيز النهائي µg/ml0.5، وسكب المزيج في قوالب الهلامات التي ركبت عليها أمشاطها المناسبة.
بعد الانتظار لفترة واكتمال تبلمر الهلامة نزعت الأمشاط بلطف لتشكل اسنانها حفراً بعد نزعها، ووضعت الهلامة في جهاز الرحلان وغمرت بكمية مناسبة من الدارئة TAE.
مُزج 20 µl من ناتج تفاعل البوليميراز المتسلسل لكل عينة (الأول أو الثاني) مع 4 µl من دارئة التحميل Loading buffer ذات التركيز 6 X، ونقل المزيج باستخدام ماصة مكروية مناسبة إلى إحدى حفر الهلامة المغمورة والموضوعة داخل جهاز الرحلان، وطبقت هذه العملية على كافة العينات.
كما وضع في الحفرة اليسارية الأولى من حفر الهلامة واسم الأطوال المعياري (سلم أطوال الـDNA) DNA Ladder .
تم بعد ذلك وصل جهاز الرحلان إلى التيار الكهربائي وطبق فرق كمون بمقدار 100 فولت، وبعد فترة كافية من الرحلان تم فحص الهلامة على جهاز توثيق الهلامة بالأشعة فوق البنفسجية Gel Documenter لتحري وجود أنطقة الـ DNA المطلوبة حيث تم الاستدلال عليها مقارنةً مع سلم الأطوال.

3-2-3- تحليل تعدد أشكال أطوال الشدف المقتطعة: RFLP Analysis

بعد التأكد من وجود نطاق الـ DNA المطلوب بطول ≈ **840 bp** أنجز تحليل تعدد أشكال أطوال الشدف المقتطعة **R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism (RFLP) على نواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل الثاني باستخدام ثلاثة إنزيمات تقييد (قطع) هي (*Ssp* I, *Vsp* I) لجميع العينات، وإنزيم (*Mbo* II) فقط للعينات البقرية، وكان مصدر الإنزيمات من شركة **Thermo,(EU) Lithuania)**، حيث وضع في أنبوب إبندورف معقم **10 µl** من نواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل الثانوي (لكل إنزيم في أنبوب مستقل) مع **18 µl** ماء معقم خال من إنزيم الدناز وكذلك **2 µl** من الدرائة الخاصة بكل إنزيم وتمت إضافة **0.5 µl** من الإنزيم وتم تحضين المزيج لمدة **ساعة ونصف** في محم مائي بدرجة 37° مئوية، تم بعدها الكشف عن نواتج التقطيع بالرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز تركيز (2%) وبتطبيق فرق كمون 50 فولت وفحصها على جهاز توثيق الهلامة بالأشعة فوق

البنفسجية، ووفق عدد وأطوال القطع الناتجة تم تحديد نوع البوغة الخفية المشخصة والجدول (3-2) يوضح شواكل أطوال القطع الخاصة بأهم أنواع البوغيات الخفية .

الجدول 3-2: شواكل التقطيع Profiles لأهم أنواع البوغيات الخفية عند الإنسان والأبقار والدجاج باستخدام إنزيمات القطع *Ssp* I, *Vsp* I, *Mbo* II (Feng et al., 2007; Xiao et al., 1999b)

مصدر العينة	الأنواع	حجم ناتج الـ PCR (bp)	نواتج التقطيع بإنزيم *Ssp*I (bp)	نواتج التقطيع بإنزيم *Vsp*I (bp)	نواتج التقطيع بإنزيم *Mbo*II (bp)
بشري	*C. parvum*	834	449, 254, 108, 12[a], 11[a]	628, 104, 102	-
	C. hominis	837	449, 254, 111, 12[a], 11[a]	561, 104, 102, 70	-
بقري	*C. parvum*	847	449, 267, 108, 12[a], 11[a]	628, 115, 104	771, 76
	C. bovis	835	432, 267, 103, 33[a]	616, 115, 104	412, 185[a], 162, 76
	C. andersoni	845	448, 397	730, 115	769, 76
	C. ryanae	835	432, 267, 103, 33[a]	616, 115, 104	574, 185[a], 76
دجاجي	*C. baileyi*	826	572, 254	620, 104, 102	-
	C. meleagridis	833	449, 254, 108, 11, 11	456, 171, 104, 102	-

[a]: **شدف لا تظهر في الرحلان الكهربائي.**

ولابد من التنويه إلى أن دارئة التحميل Loading buffer التي استخدمت في رحلان العينات التي قطعت بإنزيم *Mbo* II كانت تحتوي على 1% SDS (الجدول 3-3) وذلك وفق توصيات الشركة المصنعة للإنزيم، وحضنت مع العينة بعد تقطيعها لمدة 10 دقائق على درجة 65°C وذلك لضمان فصل هذا الإنزيم عن شدف الـDNA .

الجدول 3-3: تركيب دارئة التحميل مع 1% SDS (وفق توصيات شركة Thermo)

المادة	التركيز في دارئة التحميل
أزرق بروم الفينول Bromophenol blue	%0.03
سيانول الكزايلين ف ف Xylene cyanol FF	%0.03
جليسيرول Glycerol	%60
SDS	%1
EDTA	100mM(تم تعديل الـpH إلى 7.6 بـ Tris)

3-3- تنقية البيوض المتكيّسة للبوغة الخفية الصغيرة ودراسة إخماجيتها لدى بعض حيوانات التجارب:

Purification of *C.parvum* Oocysts and Studying its Infectivity of Some Experimental Animals

3-3-1-عزل البيوض المتكيّسة وتنقيتها جزئياً: Isolation and Partial Purification of Oocysts

بعد التأكد من وجود البيوض المتكيّسة Oocysts في نواتج الإسـهال المأخوذة من عجل رضيع بأعداد كبيرة، وبعد تنميطها، تمت تنقيتها جزئياً partial purification وفق مايلي (Current, 1990) :

في البدء تمت تصفية عينة الإسهال عدة مرات وبمصافٍ مناسبة للتخلص من الجزيئات الكبيرة، بعدها وضعت العينة في سيلندر زجاجي سعة 100 ml وأكمل ملء السيلندر بالماء وحرك المعلق جيداً وترك لمدة ساعة كي تترسب الجزيئات الثقيلة في حين تبقى البيوض المتكيّسة معلقةً في الأجزاء العلوية، سكب بعدها حوالي ثلاثة أرباع المعلق إلى بيشر نظيف وأعيدت العملية مرة ثانية على الراسب بهدف الحصول على أكبر عدد من البيوض المتكيّسة.

قسمت العينة المجموعة على أنابيب سعة 50 ml بحيث وضع في كل أنبوب جزء من العينة (حوالي 20 ml) وكمية مماثلة من الإيتر Diethyl Ether ، ورُجَّ الأنبوب لمدة 10 ثوان وثُفِّل بقوة 1000 gx لمدة 15 دقيقة.

بعد التثفيل تتشكل ثلاث طبقات (الشكل 3-3)، حيث تَمَّ التَّخلص من طبقة الإيتر العلوية والطبقة الفاصلة بين الطورين والتي تحتوي على الدهون وبعض الشوائب، ومن معظم الطور المائي، لنحصل في النهاية على راسب يتكون من البيوض المتكيّسة والجراثيم، تم غسله عدة مرات بالماء المقطر للتخلص من بقايا الإيتر، وعقب ذلك أضيف إليه محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم 2.5 % وحفظ في البراد عند 4˚ مئوية إلى حين استخدامه، وتم حساب عدد البيوض المتكيّسة الموجودة باستخدام عدادة نيوباور المعدلة المستخدمة في عد الكريات الدموية.

3-3-2- دراسة إخماجية البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* عند الهمستر والأرانب وفي أجنَّة الدجاج: Studying Infectivity of C.parvum in Hamster, Rabbits and Chicken Embryo

3-3-2-1-عند الهمستر: أنجزت التجربة على عشرة حيوانات من ذكور الهمستر السوري الذهبي التي تم إكثارها في المختبر، حيث فحصت للتأكد من خلوها من أية إصابة بالطفيلي موضوع الدراسة ، وكانت بعمر

خمسة أسابيع (بعد الفطام مباشرة)، وتراوحت أوزانها بين 30 و 40 gr، و وضع كل حيوان بصورة منفردة عن البقية، وقُدِّم العلف المخبري بصورة متساوية لكل الحيوانات، كما قُدِّمت الخضار كمصدر للماء.

الشكل 3-3: العينة بعد تثفيلها بوجود الإيتر بهدف تنقية البيوض المتكيّسة

قسمت حيوانات الدراسة إلى مجموعتين كل مجموعة مكونة من خمسة حيوانات، حيث أعطيت أفراد المجموعة الأولى فوسفات الديكساميثازون (كمثبط مناعي) حقناً تحت الجلد وبجرعة 1 gr/µg من وزن الجسم ولمدة خمسة أيام متتالية (Kim, 1987; Rasmussen and Healey, 1992; Rossi et al., 1990)، وتمت إراحتها في اليوم السادس، وأعيد حقنها في اليوم السابع، وتم إخماجها بالبيوض المتكيّسة في اليوم الثامن تجريعاً عن طريق الفم (الشكل 3-4) وبجرعة 10000 بيضة متكيسة من دون إعطائها الديكساميثازون، وحقنت بآخر جرعة من المثبط المناعي في اليوم الأول بعد الخمج (اليوم التاسع). أما المجموعة الثانية لم تُعطَ أي مثبطٍ مناعي، وخُمجت بجرعة مماثلة للمجموعة الأولى من البيوض المتكيّسة، وفي اليوم الثامن، و بالطريقة الآنفة الذكر ذاتها .

الشكل 3-4: تجريع الهمستر عن طريق الفم

جُمعت كمية البراز المطروحة من كل حيوان بشكل يومي ولمدة 15 يوماً، ووزنت، ووضع gr 0.01 منها في أنبوب إبندورف وأضيف إليها كمية من الماء المقطر حتى ml 0.5، وتم بعدها المزج الجيد ليصبح المعلق متجانساً وأخذ منه كمية µl 50 فرشت على شريحة زجاجية، وجففت وثبتت ولوِّنت باستخدام صبغة كينيون بهدف كشف البيوض المتكيّسة الموجودة وعدّها وحساب العدد الكلي الموجود في gr1 من براز الهمستر.

3-3-2-2-عند الأرانب: وكما سبق بالنسبة لمجموعتي الهمستر فقد قسمت عشرة أرانب إلى مجموعتين (5 في كل مجموعة)، وتراوحت أعمارها بين 5-7 أسابيع وبأوزان 200-250 gr، وطبقت عليها نفس خطوات التجربة السابقة عند الهمستر من حيث جرعة وبرنامج إعطاء المثبط المناعي (الديكساميثازون) وكذلك الجرعة الخامجة من البيوض المتكيّسة.

تم جمع البراز يومياً من كل حيوان بإخراج قطعة منه من المستقيم مباشرة والكشف عن وجود البيوض المتكيّسة بالطريقة نفسها التي تمَّ شرحها وإيضاحها لدى حيوانات الهمستر.

3-3-2-3-الحقن في أجنة الدجاج: (Current, 1990; Wunderlin et al., 1997)

تمّ إحضار عدد من بيض الدجاج من مصدرين مختلفين، كان الأول إحدى مزارع الهجن التجارية (ROSS) لأمات الفروج، والثاني عبارة عن بيض لدجاج بلدي وحُضِّن البيض عند الدرجة 37.7 مئوية، مع توفير الرطوبة المناسبة.

وقبل حقن بيض الدجاج، غسلت البيوض المتكيّسة المنقاة من ثنائي كرومات البوتاسيوم عدة مرات بالتثفيل، وتم تعليق الراسب في كمية مناسبة من الماء المقطر(3 مل تقريباً)، وعقمت بإضافة كمية مماثلة من هيبوكلوريت الصوديوم التجاري الممدد بتركيز 40 %، ومزجت العينة ووضعت في الثلج لمدة عشر دقائق، بعدها أضيف للعينة كمية مماثلة من الماء المقطر وثفلت بقوة gx1500 لمدة 15 دقيقة، وتم التخلص من السائل الطافي وأعيدت عملية الغسل 4 مرات، تم بعدها العدّ والتمديد ليصبح تركيز البيوض المتكيّسة 2 $X10^6$\ml وأضيف البنسلين ج بتركيز 1000 U \ml والستربتومايسين بتركيز 10mg \ ml.

حُقنت 20 بيضة دجاج (10 من كل مصدر) تحتوي على أجنة بعمر 10 أيام بجرعة 200000 بيضة متكيسة موجودة في0.1 ml من المعلق السابق ضمن الكيس السقائي المشيمائي chorioallantoic sac .

تم الحقن وتحرّي الإصابة وعدد البيوض المتكيّسة وفق الحظوات التالية:

- اختيرت نقطة فوق حدود الحجرة الهوائية بـ 2 ملم، وبعيدة عن الأوعية الدموية.

– تم مسح القشرة بالكحول وثقبت باستخدام رأس محقن قياس G 23.

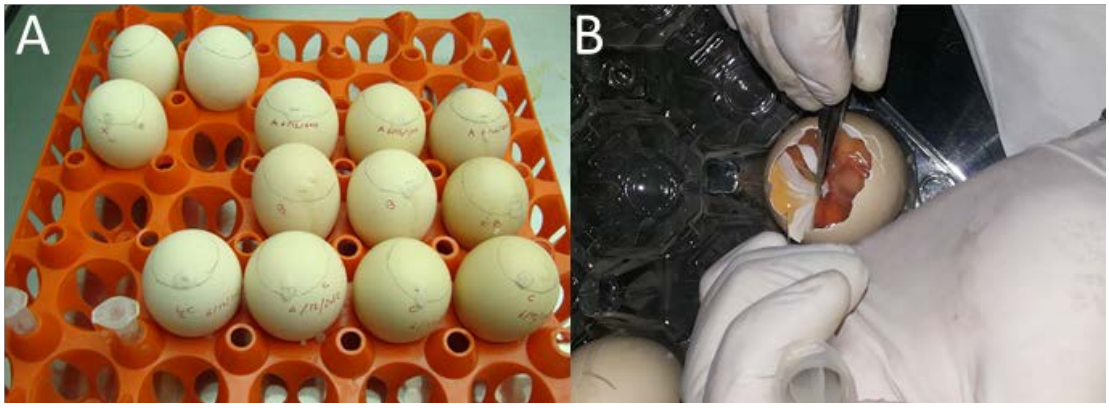
– حقنت كمية ml 0.1 من معلّق البيوض المتكيّسة باستخدام محقن قياس رأسه G 27 ، وذلك عبر الثقب المحدث في القشرة ونحو الأسفل بزاوية °45.

– تم سد الثقب بقطرة من الشمع وأعيد البيض المحقون إلى الحضّانة (الشكل 3–5 A) .

– بعد 7 أيام أزيلت القشرة المغطية للحجرة الهوائية وسحب السائل السقائي المشيمائي (الشكل 3–5 B).

– أخذ ml 2 من السائل السقائي المشيمائي وتَمَّ تثفيله وغسل الراسب 3 مرات بالماء المقطر المضاف له Tween 20 بنسبة 0.02% .

– تمّ كشف وعدُّ البيوض المتكيّسة باستخدام عدادة نيوباور المعدلة وحساب العدد الموجود في ml 1 من السائل السقائي المشيمائي.



الشكل 3–5: حقن أجنة بيض الدجاج

A : البيض المخصب بعد حقنه وإغلاق مكان الحقن بالشمع، B: طريقة سحب السائل السقائي المشيمائي

3–3–3–التحليل الإحصائي: Statistical Analysis

تم حساب قيمة L.S.D. (أقل فرق معنوي)، عن طريق تحليل (ANOVA) باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS 17 .

-الفصل الرابع-

النتائج

Results

4-النتائج Results

تمَّ الكشف عن البيوض المتكيّسة لطفيلي البوغة الخفية في جميع مصادر العينات البشرية والحيوانية وبنسبٍ مختلفة وذلك نتيجة الفحوصات اعتماداً على صبغة كينيون الصامدة للحمض، وحُدِّدت الأنواع التي أصابت كلاً من الأبقار والدجاج والإنسان باستخدام تحليل PCR-RFLP، كما شُخِّصت بعض الطفيليات الأوالي التي وجدت في العينات البشرية (إسهال الأطفال دون الخامسة من العمر)، وأخيراً حُدِّدت إخماجية البوغة الخفية الصغيرة *Cryptosporidium parvum* (النوع الأكثر أهمية في هذه الدراسة) عند الهمستر السوري والأرانب وفي أجنَّة الدجاج.

4-1- نتائج فحص العينات وتحديد الأنواع:

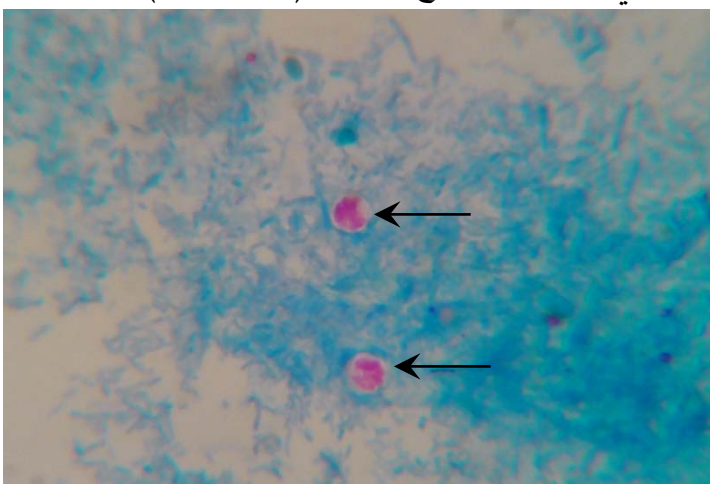
Results of Samples Examination and Species Detection

4-1-1- نتائج الفحوصات الطفيلية: Results of Parasitological Examinations

4-1-1-1- نتائج صبغة كينيون الصامدة للحمض: Results of Kinyoun's Acid Fast Stain

4-1-1-1-1-عند الإنسان:

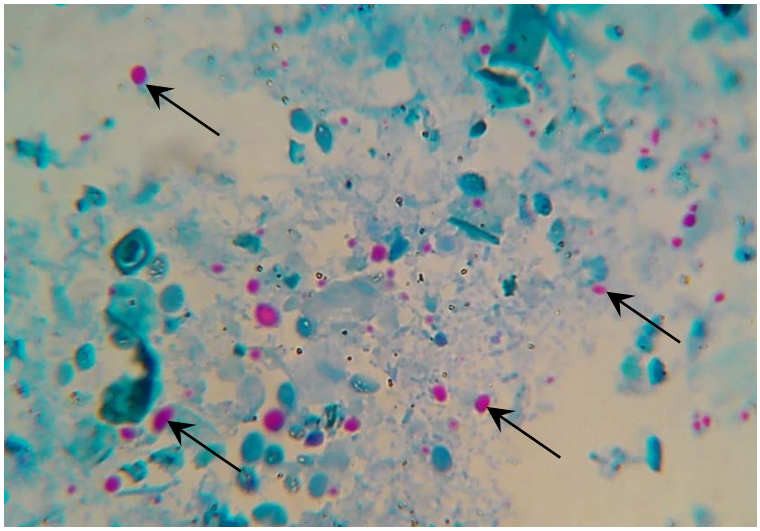
كان عدد العينات الإيجابية بعد فحص عيّنات إسهال الأطفال بطريقة اللطخة المباشرة 7 عينات (جمعت جميعها من مدينة دمشق) من مجمل 213 عينة، أي بنسبة 3.2% إذ لوحظت البيوض المتكيّسة بشكل دائري تقريباً وبلون زهري أو أحمر ضمن محيط أزرق، وأمكن رؤية الحيوانات البوغية الأربعة داخل بعض تلك البيوض المتكيّسة في عدد من الشرائح الملونة (الشكل 4-1).



الشكل 4-1: البيوض المتكيّسة للبوغيات الخفية بعد صباغتها بطريقة كينيون (x2000)

لم يختلف عدد العينات المصابة بعد تطبيق طريقة الفورمول–إيتر التركيزية على البراز المجموع من الأطفال المصابين بالإسهال واقتصر العدد على العينات السبعة التي ذكرت آنفاً والتي شُخِّصت بعد إنجاز اللطخة المباشرة.

إن الأمر الهام الذي لابد من الإشارة إليه هو ضرورة الانتباه أثناء فحص اللطاخات الملونة بطريقة كينيون الصامدة للحمض إلى أن بعض أبواغ الفطور أو القطيرات الدهنية قد تحتفظ باللون الأحمر ممّا يقلل من نوعية هذه الطريقة في الكشف عن الطفيلي ويزيد من احتمالات التشخيص الخاطئ (الشكل 4–2)، ولابد للفاحص من أن يتمتع ببعض الخبرة للتمييز بين البيوض المتكيّسة للبوغيات الخفية وما قد يشاهده من أمور أخرى قد تسبب له الالتباس في التشخيص.



الشكل 4–2: قطيرات دهنية بلون وردي في لطاخة محضرة من عينة بشرية (x2000)

تتجلّى النقاط الفارقة التي تمكننا من تمييز البيوض المتكيسة للبوغيات الخفية عن غيرها من الأشكال المشابهة لها باللون تحت المجهر بأمرين أساسيين هما القياس والبنية، إذ تكون البيوض المتكيسة في العينة المصابة ذاتَ أحجام وأشكال متماثلة تقريباً، في حين تكون القطيرات الدهنية ذاتَ أحجام مختلفة (منها الصغير ومنها الكبير) وبأشكال متباينة (الدائري والمتطاول والبيضي، وغيرها)، أما من ناحية البنية فتأخذ البيوض المتكيسة اللون الوردي أو الأحمر بصورة غير متجانسة أو غير مكتملة وقد تلاحظ الحيوانات البوغية الأربعة في بعضها، في حين تصطبغ القطيرات الدهنية باللون الوردي بصورة متجانسة.

كما قد تشاهد أيضاً في العينات بعض الخمائر Yeastes التي قد تكون مشابهة بالحجم للبوغة الخفية لكنها تأخذ اللون الأزرق بعد التلوين بالصبغات الصامدة للحمض. كما ستُذكر لاحقاً بعض الطفيليات الأوالي التي سُجَّل وجودها في العينات البشرية المفحوصة.

4-1-1-1-2-عند العجول الرضيعة والأبقار البالغة:

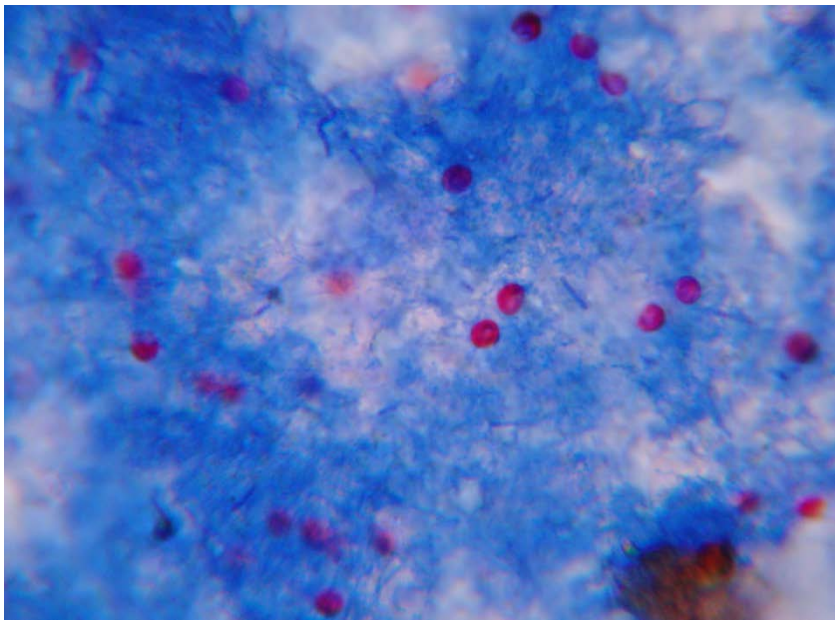
كان عدد العينات البقرية المصدر (عجول رضيعة وأبقار بالغة) التي وجد فيها طفيلي البوغة الخفية بعد فحصها بطريقة اللطخة المباشرة 23 عينة من أصل 133 عينة مفحوصة، أي بنسبة 20.35%، وتوزعت العينات الإيجابية تبعاً للفئة العمرية حيث كان عدد العينات المصابة المجموعة من عجول رضيعة مصابة بالإسهال 19 (17 من محافظة حماة، و2 من محافظة حمص) من أصل 69 عينة، أي بنسبة 27.5%، في حين كان العدد لدى الأبقار البالغة 4 عينات مصابة (العينات الأربع من حماة) من أصل 44 عينة، أي بنسبة 9.1%. (الجدول 4-1)

الجدول 4-1: عدد العينات البقرية المصابة موزعة تبعاً لمصدرها وعمر الحيوان

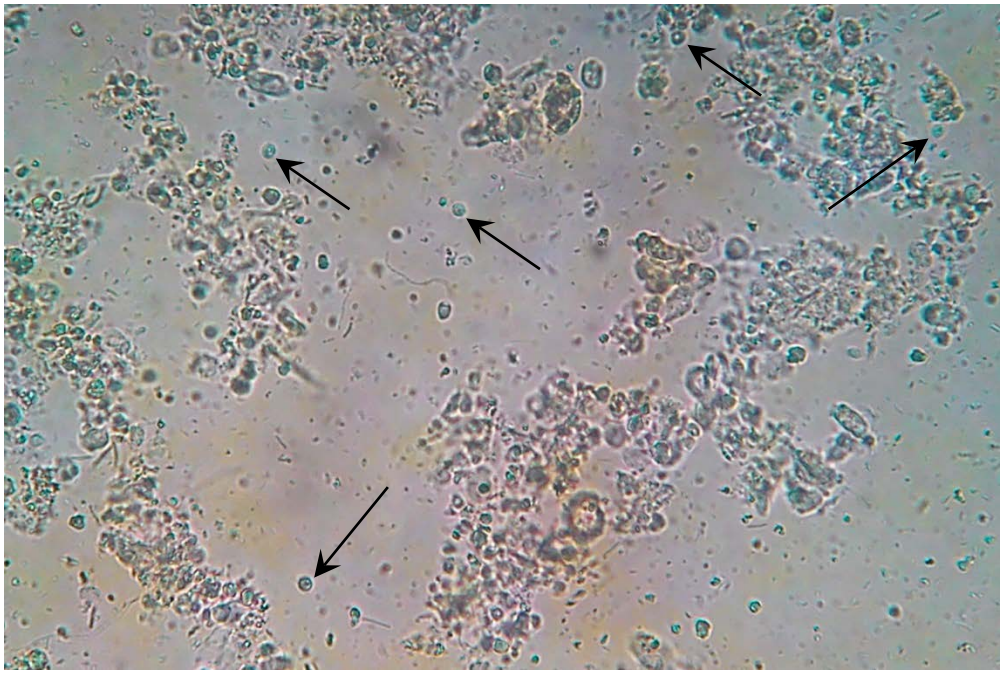
المحافظة	عجول رضيعة (n=69)	أبقار بالغة (n=44)
حماة	(n=55) 17	(n=25) 4
حمص	(n=14) 2	(n=19) 0
المجموع والنسبة المئوية	**(%27.5)19**	**(%9.1) 4**

كانت أعداد البيوض المتكيسة المشاهدة تحت المجهر كبيرة في معظم العينات المصابة بالطفيلي والمجموعة من العجول الرضيعة (الشكل 4-3، والشكل 4-4)، بينما كانت الأعداد في العينات الإيجابية المأخوذة من أبقار بالغة سليمة ظاهرياً قليلة واحتاجت إلى فحصٍ مجهري أدق، وفي أغلب الأحيان تمَّ فحص أكثر من لطاخة واحدة لتأكيد نتيجة التشخيص.

وكما هو الحال في العينات البشرية تطابقت نتائج طريقة الفورمول- إيتر التركيزية مع نتائج اللطخة المباشرة عند العجول الرضيعة، لكن الأمر الذي تمَّ ملاحظته أثناء هذا العمل هو أن طريقة الفورمول- إيتر التركيزية كانت عديمة الجدوى عند تطبيقها على عينات الروث المجموعة من الأبقار البالغة، وذلك لأنَّ اللطاخات المصبوغة المحضرة من الراسب الناتج قد احتوت على كمية كبيرة جداً من الجزيئات الرملية والشوائب التي أخذت اللون الأحمر والتي جعلت القدرة على التشخيص والرؤية المجهرية أمراً بالغ الصعوبة.



الشكل 4-3: البيوض المتكيسة للبوغة الخفية في إحدى العينات المجموعة من عجل رضيع بعد صباغتها بملون كينيون (x2000)



الشكل 4-4: البيوض المتكيسة للبوغة الخفية في إحدى العينات المجموعة من عجل رضيع من دون صباغة (x800)

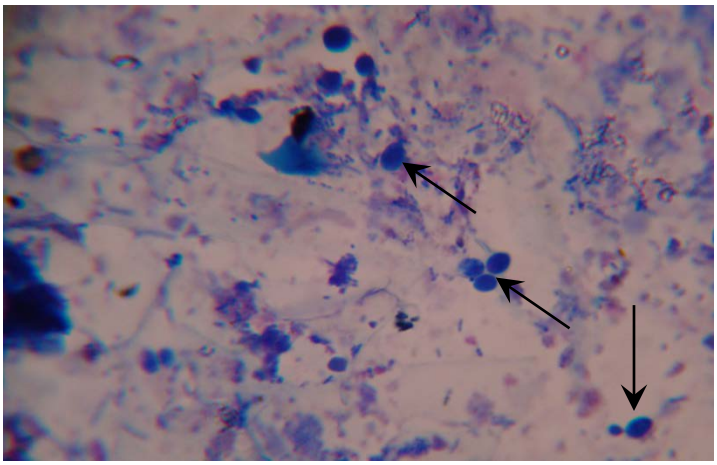
4-1-1-1-3-عند الدجاج:

تمَّ الكشفُ عن وجود البوغيات الخفية في 9 عينات (8.1%) من مجمل 111 عينةِ زرقٍ جُمعت من قطعان دجاج اللحم وذلك بعد فحص لطاخاتٍ مباشرة من العينات وصبغت بطريقة كينيون الصامدة للحمض، وارتفع عدد العينات الإيجابية إلى 11 (9.9%) عينة بعد تطبيق طريقة الفورمول-إيتر التركيزية، أي أن الطريقة التركيزية كانت مفيدةً وأكثر حساسية في الكشف عن وجود البيوض المتكيسة (الجدول 4-2).

وكما هو الحال في العينات التي جمعت من الأطفال والعجول والأبقار، يجب الانتباه إلى وجود بعض الشوائب التي قد تؤدي إلى التشخيص الخاطئ، ولابد من الإشارة هنا إلى أنه تمت ملاحظة خلايا خمائرية Yeastes في الكثير من العينات المفحوصة، وهي قد تتماثل مع البيوض المتكيسة للبوغيات الخفية في الحجم ولكنها ليست صامدة للحمض وتتلون بالأزرق عند تطبيق طريقة كينيون الصامدة للحمض في التشخيص (الشكل 4-5).

الجدول 4-2: عدد قطعان دجاج اللحم المصابة موزعة تبعاً لمصدرها، ونسبتها المئوية

مصادر العينات(n=111)	عدد القطعان المصابة
حماة (n=64)	7
حمص (n=3)	0
ريف دمشق (n=3)	3
طرطوس (n=30)	0
حلب (n=8)	1
المجموع والنسبة المئوية	**11 (9.9%)**



الشكل 4-5: الخلايا الخمائرية في لطاخة محضرة من زرق دجاج اللحم ومصبوغة بطريقة كينيون (x2000)

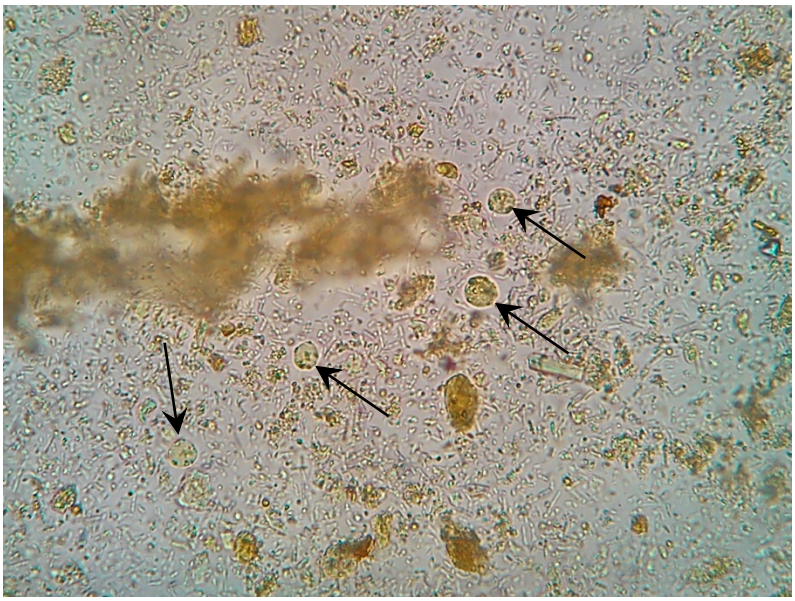
4-1-1-2- الكشف عن الأوالي الطفيلية الأخرى في عينات بِراز الأطفال:
Detection of Other Parasitic Protozoa in Children Stool Samples

سُجِّلَ وجود عددٍ من الطفيليات الأوالي في براز الأطفال بعد تحضير لطاخات رطبة وملونة بمحلول لوغول (الجدول 4-3)، وكان أكثر تلك الطفيليات مشاهدةً هي الكيســـة الأريميّة البشرية *Blastocystis hominis* إذ وجدت في 27 عينة أي بنسبة 12.6% من مجموع 213 عينة براز شملتها الفحوصات (الشكل 4-6).

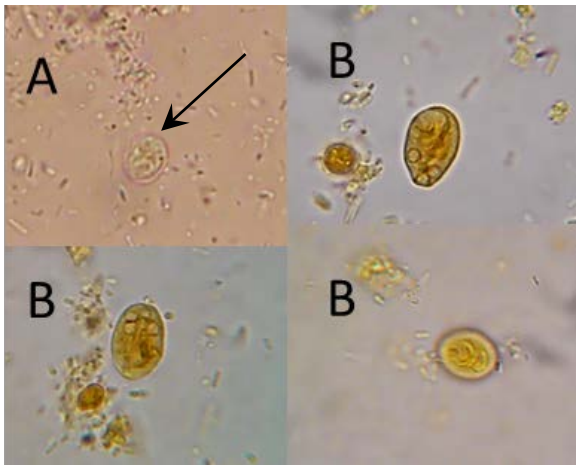
ومن الأوالي المهمة التي شخصت أثناء الفحوصات كانت الجيارْدِيَّة اللَّمبِلِيَّة، حيث وجدت في 18 عينة وبنسبة 8.4% من مجمل العينات، إذ تمت رؤية كيساتها في معظم الحالات المصابة، و تتميز تلك الكيسات بنواها الأربع وبقايا جهازها الحركي (السياط) والجسمين المنصِّفين Median bodies (الشكل 4-7) في حين لوحظ الطور الناشط ذو الشكل الكمثري المميَّز في بعض تلك العينات (الشكل 4-8) .

شُخِّصَ أيضاً وجود المتحولة القولونية *Entamoeba coli* في 4 حالاتٍ (1.8%)، والمتحولة الحالّة للنسج *Entamoeba histolytica* في حالتين (0.9%)، والمُشَعَّرَة المعويّة *Trichomonas intestinalis* في حالة واحدة فقط (0.4%).

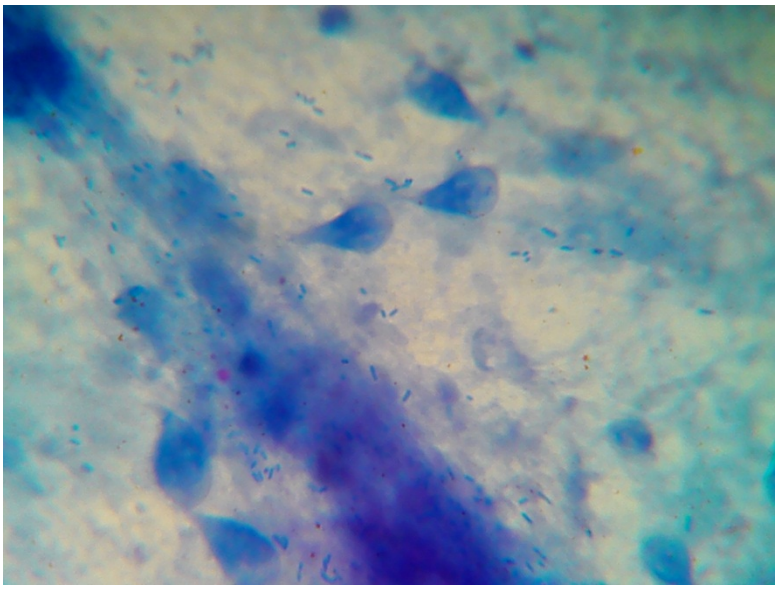
كما لوحظ وجود خلايا خمائرية (شبيهة جداً بالمبيضة البيضاء *Candida albicanis*) في 12 عينة وبنسبة 5.6%.



الشكل 4-6: الكيسة الأريمية البشرية في إحدى العينات ملونة بمحلول لوغول (x800)



الشكل 4-7: كيسات الجيارديةِ اللَّمبِلِيّةِ، A: كيسة في لطاخة رطبة من دون أية صباغة، B: كيسات من لطاخات رطبة ملونة بمحلول لوغول (x1000)



الشكل 4-8: الطور الناشط للجيارديّة اللمبليّة في لطاخة جافة مصبوغة بأزرق الميتيلين(x800)

الجدول 4-3: الطفيليات الأوالي (من غير البوغيات الخفيّة) المُشخَّصة في براز الأطفال

الطفيلي	الكيسة الأريميّة البشرية	الجيارديّة اللمبليّة	المتحولة القولونية	المتحولة الحالة للنسج	المُشَعَّرَة المعوية	الخمائر(فطور)
عدد العينات الإيجابية (n=213)	27	18	4	2	1	12
النسبة المئوية%	12.6	8.4	1.8	0.9	0.4	5.6

4-1-2- نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشّش وتحليل تعدد أشكال أطوال الشُدَف المقتطعة: Results of Nested-PCR Test and RFLP Analysis

4-1-2-1- نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشّش: Results of Nested-PCR Test

واجه هذا الاختبار عدة صعوبات تمَّ تجاوزها ليُنجزَ بعدها بالشكل المطلوب والأمثل، وأتت هذه الصعوبات من حساسية تفاعل البوليميراز المتسلسل عند تطبيقه على مادةٍ وراثيّةٍ مستخلصةٍ من البراز أو الروث وذلك لاحتواء البراز على مثبطاتٍ للتفاعل قد تبقى موجودةً في العينة حتى بعد استخلاصها بالعتائد المناسبة. كما أن أعداد الطفيلي كانت قليلة في كثير من العينات الأمر الذي يؤدي بدوره إلى قلة المادة الوراثية المستخلصة والتي تُعدُّ النقطة الأهم والقالب الأساس الذي سينطلق منه تفاعل الـ PCR.

وانعكست الصعوبات السابقة على النتائج في أمرين أساسيين، أولهما فشل التفاعل كلياً في بعض العينات المجموعة من قطعان الدجاج ومن الأطفال ممّا تطلب إعادة عملية الاستخلاص مرة أخرى، وثانيهما وهو الأهم سلبية تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش الأول في كثيرٍ من الحالات عند تطبيقه على العينات المجموعة من الدجاج والأطفال والأبقار البالغة (الجدول 4-4).

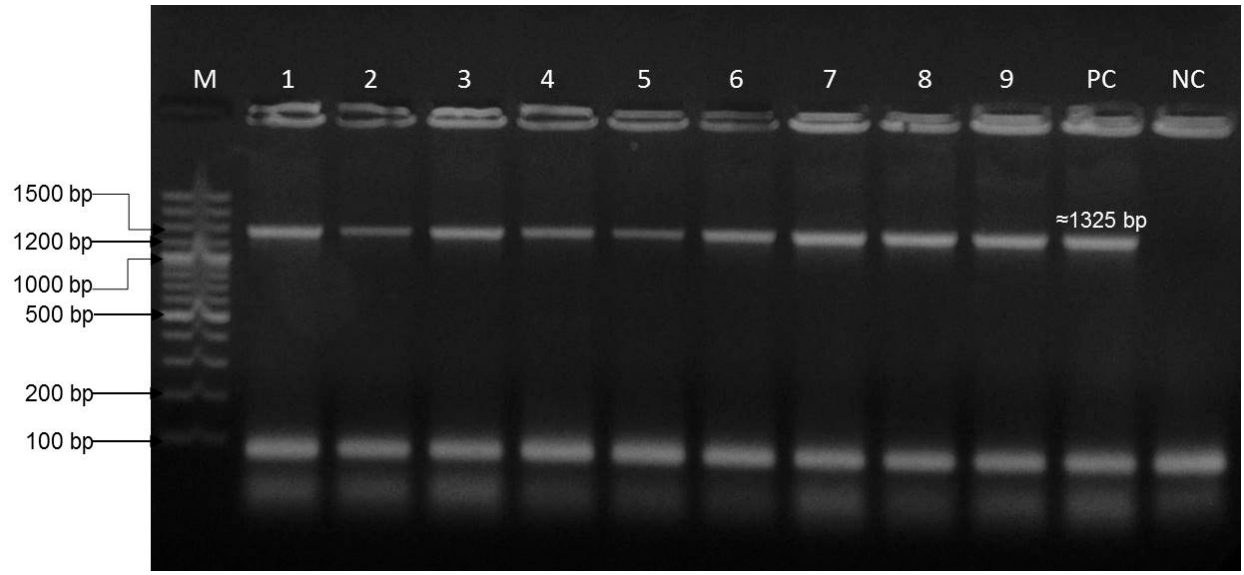
الجدول 4-4: عدد العينات الإيجابية بعد كل من المرحلة الأولى والثانية من تفاعل Nested-PCR

مصدر العينات	عدد العينات الإيجابية نتيجة الفحص المجهري	عدد العينات الإيجابية بعد المرحلة الأولى من تفاعل Nested-PCR	عدد العينات الإيجابية بعد المرحلة الثانية من تفاعل Nested-PCR
الأطفال	7*	2	7
العجول الرضيعة	19	19	19
الأبقار البالغة	4	0	4
دجاج اللحم	11*	4	11
المجموع	**41**	**26 (%63.4)**	**41**

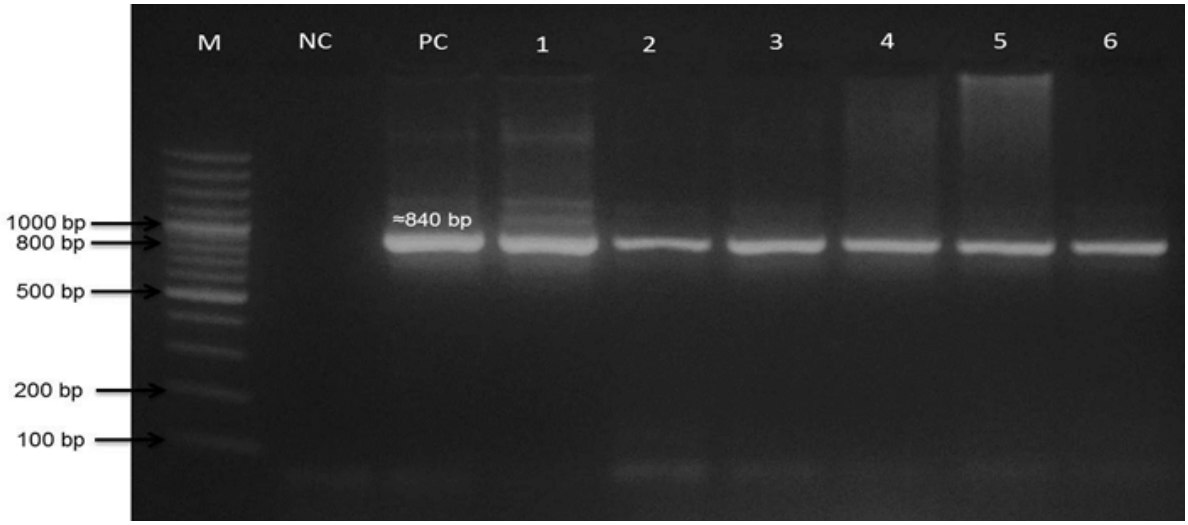
* : أُعيد استخلاص عدد قليل من العينات بعد فشل الاختبار بمرحلتيه الأولى والثانية.

أظهرت النتائج الإيجابية بعد إنجاز التفاعل الأول من اختبار Nested-PCR وجود أنطقة (شرائط) Bands من الـDNA بطول ~ 1325 bp (في 26 عينة من أصل 41) وذلك بعد فحص ناتج التفاعل بالرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز (الشكل 4-9)، علماً أن التفاعل الثاني (المرحلة الثانية) من اختبار Nested-PCR طُبِّقَ على جميع نواتج التفاعل الأول وبغضِّ النظر عن النتيجة إن كانت سلبية أو إيجابية.

وطابقت نتائج التفاعل الثاني (المعشش) من اختبار Nested-PCR نتائج التشخيص المجهري المباشر للطفيلي، إذ كانت جميع العينات المختبرة إيجابية بعد فحص نواتج التفاعل الثاني بالرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز، ولوحظ وجود أنطقة من الـ DNA بطول ~ 840 bp وبذلك فإن نتائج التفاعل الثاني كانت أكثر دقة ووضوحاً (الشكل 4–10).



الشكل 4–9: نتائج بعض العينات الإيجابية نتيجة التفاعل الأول من اختبار Nested-PCR تبدو فيها أنطقة الـDNA بطول 1325 bp تقريباً، PC: شاهد إيجابي، NC: شاهد سلبي، M: مُعَلِّم أطوال الـDNA ،الأعمدة 1–9 عينات إيجابية



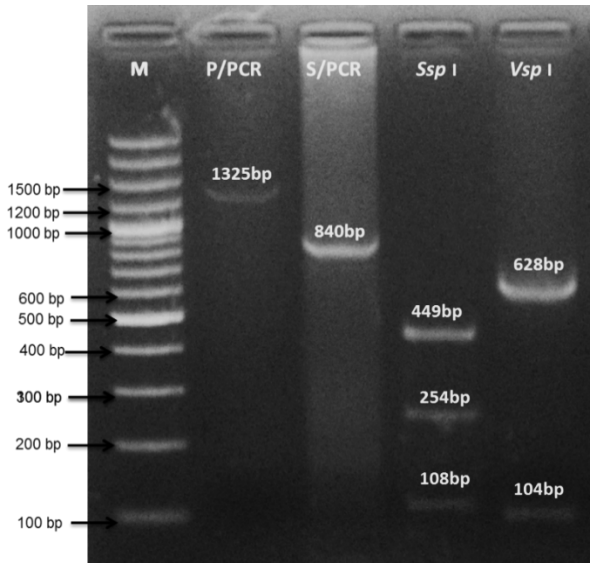
الشكل 4–10: نتائج بعض العينات الإيجابيّة نتيجة التفاعل الثاني من اختبار Nested-PCR وتبدو أنطقة الـDNA بطول 840 bp تقريباً، PC: شاهد إيجابي، NC: شاهد سلبي، M: مُعَلِّم أطوال الـDNA ،الأعمدة 1–6 عينات إيجابية

4-1-2-2- نتائِج تَحليل تَعدُّد أشكال أطوال الشُّذَف المُقْتَطَعَة: Results of RFLP Analysis

تعدُّ معرفة أنواع البوغيات الخفية المشخصة نتيجة الفحوصات والمراحل السابقة المنجزَة جوهر هذا العمل والنقطة الفارقة والرئيسة فيه، وتم تحديد الأنواع اعتماداً على تحليل RFLP حيث استخدم فيه إنزيما قطع الـDNA وهما *Vsp* I و *Ssp* I عند تطبيقه على نواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل الثاني للعينات الدجاجية والبشرية، في حين أضيف للإنزيمين السابقين إنزيم *Mbo* II عند تقطيع نواتج تفاعل PCR الثاني للعينات ذات المصدر البقري (عجول رضيعة وأبقار بالغة).

4-1-2-2-1- أنواع البوغيات الخفية المشخصة عند الأطفال:

كان نوع **البوغة الخفية الصغيرة *Cryptosporidium parvum*** هو الوحيدُ المشخَّصُ عند الأطفال السبعة المصابين بالإسهال والذين شُخص وجود البيوض المتكيسة للبوغيّات الخفيّة في بِرازهم، إذ لوحظ نتيجة تقطيع نواتج تفاعل الـPCR الثاني (التي كانت بطول 840 زوج أساس تقريباً) بإنزيم *Ssp* I ظهور 3 أنطقة للـDNA بعد الرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز وبأطوال **bp**449 و **bp**254 و **bp**108 ، وعند تقطيع النواتج ذاتها بإنزيم *Vsp* I ظهر نطاقان فقط بأطوال **bp**628 و **bp**104 ، وبالرجوع إلى (الجدول 3-2) يمكن مطابقة الشاكلة Profile الخاصة بالبوغة الخفية الصغيرة مع نواتج التقطيع لإحدى العينات البشرية في (الشكل 4-11)، علماً أنه في الواقع ينتج بعد التقطيع بإنزيم *Vsp* I ثلاثة قطع لكن اثنتين منهما أطوالهما متقاربة (102 و **bp**104) وهي تظهر في نفس النطاق بعد الرحلان الكهربائي.

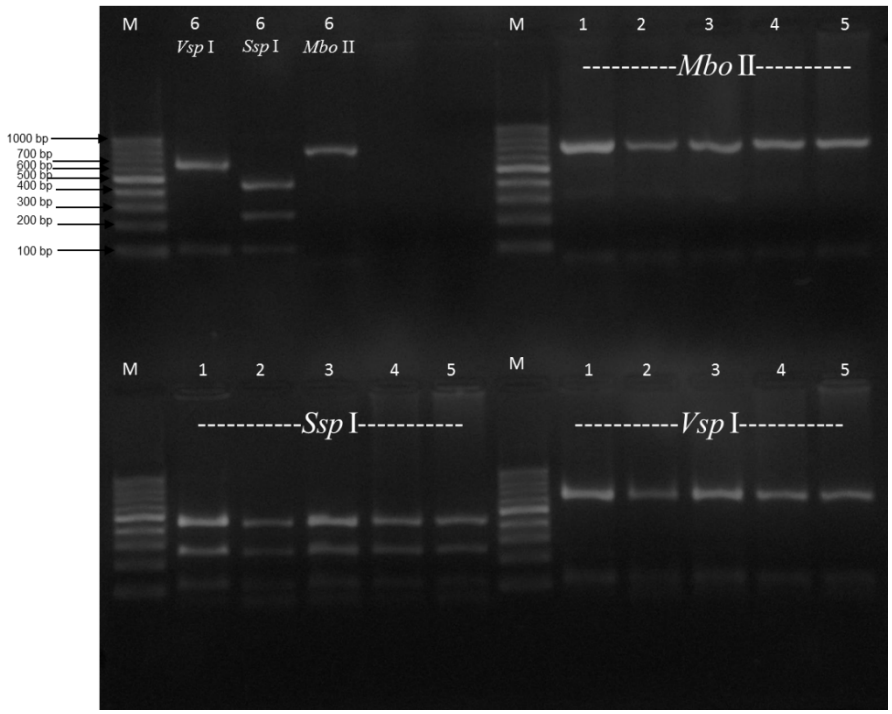


الشكل 4-11: نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش(الأولي P/PCR والثاني S/PCR) لعزولة من البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* عند الإنسان، ونواتج تحليل RFLP باستخدام إنزيمي قطع هما (*Ssp* I, *Vsp* I)

4-1-2-2-2- أنواع البوغيات الخفية المشخصة عند العجول الرضيعة والأبقار البالغة:

لقد أسفرت نتائج تحليل RFLP عند **العجول الرضيعة** اعتماداً على ثلاثة إنزيماتٍ لقطع الـDNA الناتج من تفاعل الـPCR الثاني إلى تشخيص نوع **البوغة الخفية الصغيرة** في جميع العينات المفحوصة (الشكل 4-12)، إذ لوحظ بعد القطع بإنزيم *Ssp* I ظهور 3 أنطقة للـDNA بعد الرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز وبأطوال 449 و 267 و 108 زوج أساس، ونطاقان عند القطع بإنزيم *Vsp* I بأطوال 628 و 115 زوج أساس، علماً أنه في الواقع ينتج بعد التقطيع بإنزيم *Vsp* I ثلاث قطع لكن اثنتان منهما أطوالهما متقاربة (115 و 104) وتظهران في نفس النطاق بعد الرحلان الكهربائي (الجدول 3-2).

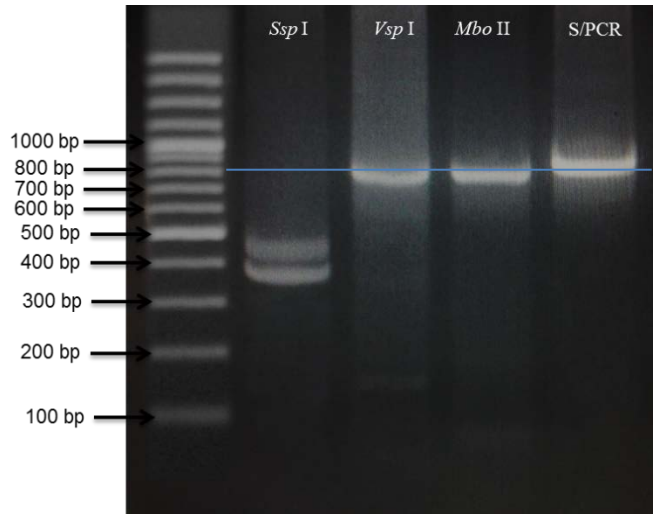
أما الإنزيم الثالث *Mbo* II فقد أدى إلى ظهور نطاقين بعد الرحلان الكهربائي وبأطوال 771 و 76 زوج أساس، وهذه الشاكلة Profile مطابقة لتلك الخاصة بالبوغة الخفية الصغيرة (الجدول 3-2).



الشكل 4-12: نواتج تحليل RFLP لست عزولات من البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* عند العجول الرضيعة باستخدام ثلاثة إنزيمات قطع هي (*Ssp* I, *Vsp* I, *Mbo* II).

استخدمت الإنزيمات الثلاثة ذاتها التي استخدمت لمعرفة الأنواع التي تصيب العجول الرضيعة عند إنجاز تحليل RFLP على العينات المأخوذة من **الأبقار البالغة**، وأظهرت النتائج تشخيص نوع **البوغة الخفية الأندرسونية *C. andersoni*** في العينات الأربع التي تأكد اصابتها بالطفيلي.

حيث لوحظ نتيجة تقطيع نواتج تفاعل الـPCR الثاني بإنزيم *Ssp* I ظهور نطاقين من الـDNA بعد الرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز وبأطوال 448 و 397 زوج أساس، وعند تقطيع ذات النواتج بإنزيم *Vsp* I ظهر نطاقان فقط بأطوال 730 و 115 زوج أساس ، ونطاقان أيضاً بعد التقطيع بإنزيم *Mbo* II وبأطوال 769 و 76 زوج أساس (الشكل 4–13).



الشكل 4–13: نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش الثاني S/PCR لإحدى عينات البوغة الخفية الأندرسونية *C. andersoni* ، ونواتج تحليل RFLP باستخدام إنزيمات قطع هي (*Ssp* I, *Vsp* I, *Mbo* II)

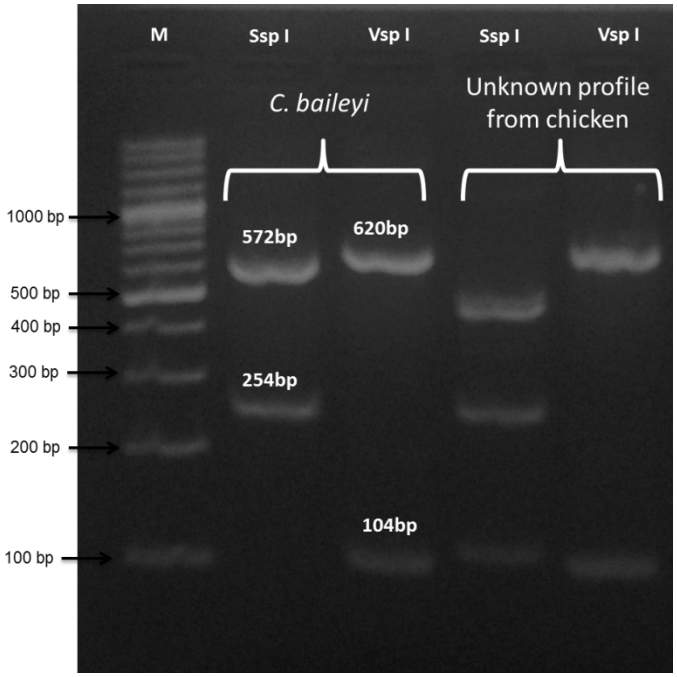
4–1–2–2–3– أنواع البوغيات الخفية المشخصة في قطعان دجاج اللحم:

تمَّ الاعتماد على الإنزيمين *Vsp* I و *Ssp* I في إتمام تحليل RFLP لتحديد أنواع البوغيات الخفية عند الدجاج، وأظهرت النتائج وجود نوع البوغة الخفية البيليّة *Cryptosporidium baileyi* في 9 عينات من أصل الـ11 عينة تم تأكيد إصابتها بالطفيلي أي بنسبة 81.8 % من العينات المصابة، إذ أدت عملية القطع بإنزيم *Ssp* I إلى ظهور نطاقين من الـDNA (بعد فحص النواتج بالرحلان الكهربائي) بأطوال 572 و 254 زوج أساس، كما أعطت عملية القطع بإنزيم *Vsp* I نطاقين أيضاً بأطوال 620 و 104 زوج أساس (الشكل 4–14)، علماً أنه في الواقع ينتج بعد التقطيع بإنزيم *Vsp* I ثلاثة قطع لكن اثنتين منهما أطوالهما متقاربة (102 و 104) وتظهر في نفس النطاق بعد الرحلان الكهربائي (الجدول 3–2).

أظهرت نتائج تحليل تعدد أشكال أطوال الشدف المقتطعة RFLP لعينتين جُمعتا من قطيعين من دجاج اللحم تمَّت تربيتهما في مزرعتين متجاورتين في ريف حماة (منطقة سلمية) إصابتهما بنوع من البوغيات الخفية اتّصف بشاكلةٍ Profile غير مألوفة (غير معروفة) Unknown profile عند الدجاج وذلك عند

مقارنتها مع الأنواع التي ذكرتها الأبحاث والمراجع على أنها تصيب الدجاج، علماً أن نمط الشاكلة التي تظهر بعد الرحلان تشبه وإلى حد كبير تلك التي ظهرت عند البوغة الخفية الصغيرة (الشكل 4-14).

ويوضح (الجدول 4-5) أنواع البوغيات الخفية المشخصة في هذا العمل نتيجة تحليل RFLP وموزعة بحسب مصدرها.



الشكل 4-14: نواتج تحليل RFLP لإحدى العزولات من البوغة الخفية البيلية *C. baileyi* عند الدجاج باستخدام إنزيمات القطع (*Ssp* I, *Vsp* I)، ومقارنتها مع عزولة أخرى لم تماثل شاكلتها أياً من الأنواع التي تصيب الدجاج

الجدول 4-5: أنواع البوغيات الخفية المشخصة نتيجة تحليل RFLP في العينات بحسب مصدرها

مصدر العينات	عدد العينات المصابة بالبوغيات الخفية	أنواع البوغيات الخفية المشخصة نتيجة تحليل RFLP	عدد العينات التي وجد فيها كل نوع من البوغيات الخفية
الأطفال	7	البوغة الخفية الصغيرة *Cryptosporidium parvum*	7
العجول الرضيعة	19	البوغة الخفية الصغيرة *Cryptosporidium parvum*	19
الأبقار البالغة	4	البوغة الخفية الأندرسونية *Cryptosporidium andersoni*	4
دجاج اللحم	11	البوغة الخفية البيليّة *Cryptosporidium baileyi*	9
		نمط ذو شاكلة غير معروفة Unknown profile	2

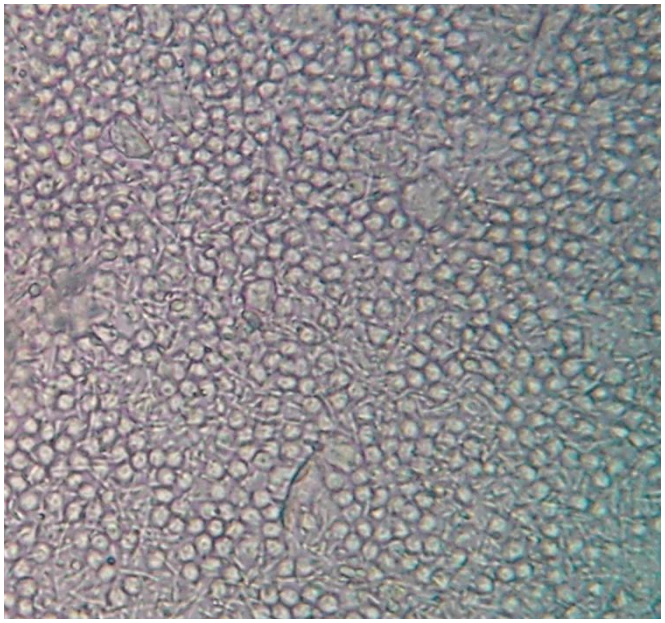
4-2- دراسة إخماجية البوغة الخفية الصغيرة عند الهمستر السوري والأرانب وفي أجنة الدجاج:

Studying of *Cryptosporidium parvum* Infectivity in Syrian Hamster, Rabbit and Chicken Embryos

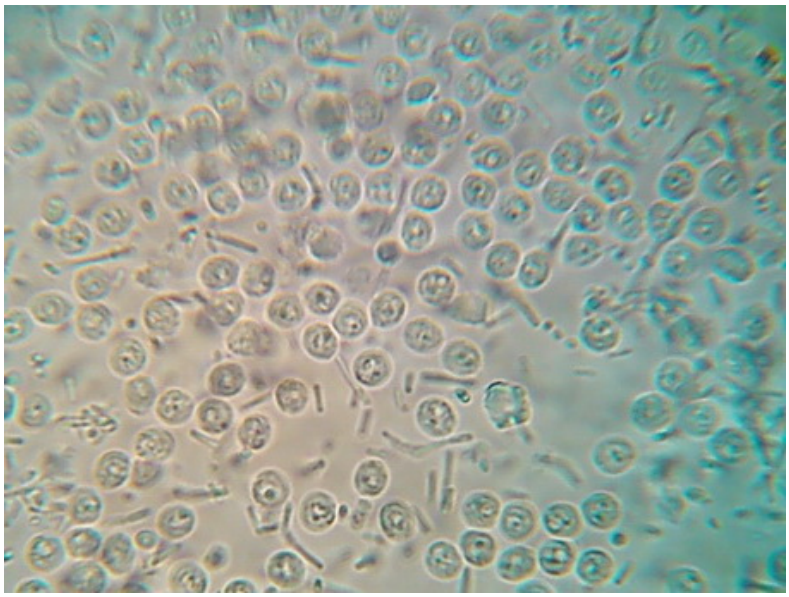
4-2-1- نتائج تنقية البيوض المتكيسة للبوغة الخفية الصغيرة:

Result of *C. parvum* Oocysts Purification

طبقت مراحل التنقية على 3 عينات من ناتج الإسهال المجموع من ثلاثة عجول كانت مصابة بالبوغة الخفية الصغيرة، وذلك بعد التأكد من أن العينات لا تحتوي إلا على نوع واحد من البوغيات الخفية هو البوغة الخفية الصغيرة، حيث تم عزل البيوض المتكيسة وتنقيتها جزئياً (الشكل 4-15)، وقد اختلفت الأعداد المجموعة تبعاً لشدة الإصابة (تم الحصول على 80000000 بيضة متكيسة منقاة من 50 مل من إحدى العينات)، ونتيجة لذلك توفرت أعداد كبيرة خالية من الشوائب قابلة للعد ومشوبة فقط بالجراثيم (الشكل 4-16) التي تفقد حيويتها بعد فترة من حفظها بمحلول ثنائي كرومات البوتاسيوم $K_2Cr_2O_7$ (مادة مؤكسدة) في حين تحافظ البيوض المتكيسة على حيويتها من 3 إلى 6 شهور على الأقل، وقد تصل حتى السنة مما يُمكّن من إجراء الدراسات المختلفة على هذا الطفيلي.



الشكل 4-15: البيوض المتكيسة المتكدسة بعد عزلها وتنقيتها (x 800)



الشكل 4-16: البيوض المتكيسة بعد عزلها وتنقيتها (x 2000)

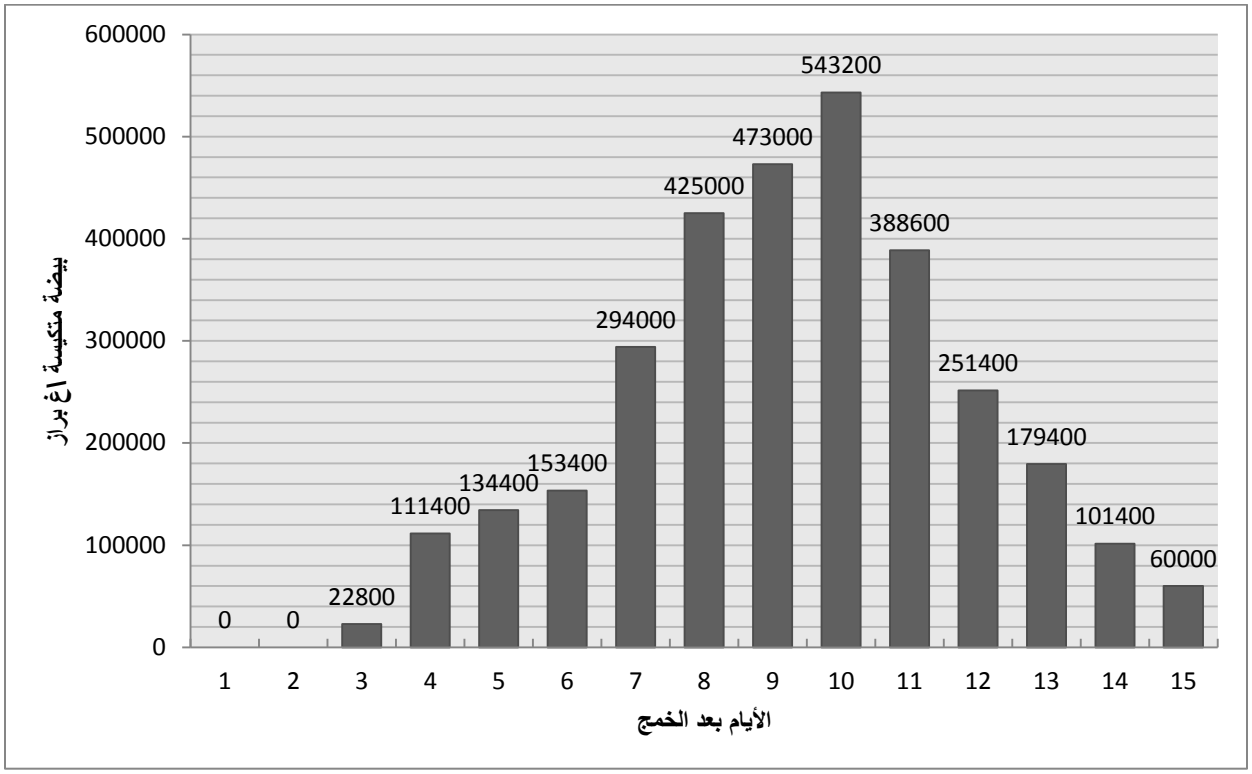
4-2-2- نتائج إخماجية البوغة الخفية الصغيرة عند الهمستر والأرانب:
Results of *Cryptosporidium parvum* Infectivity in Syrian Hamster and Rabbit

لدى دراسة إخماجية البوغة الخفية الصغيرة المعزولة لحيوانات الهمستر بعمر خمسة أسابيع والتي قسمت لمجموعتين، ثُبِّطت إحداهما مناعياً وأخرى سليمة، أظهرت النتائج إصابة كل الحيوانات بالطفيلي وطرحه مع برازها (تراوحت كمية البراز المطروحة يومياً بين 1.1و2.3 غرام) علماً أنه لم يلاحظ حدوث الإسهال أو أي تغير في قوام البراز عند أي من الحيوانات، إلا أنه تباينت الأعداد المطروحة بشكل كبير وواضح بين المجموعتين.

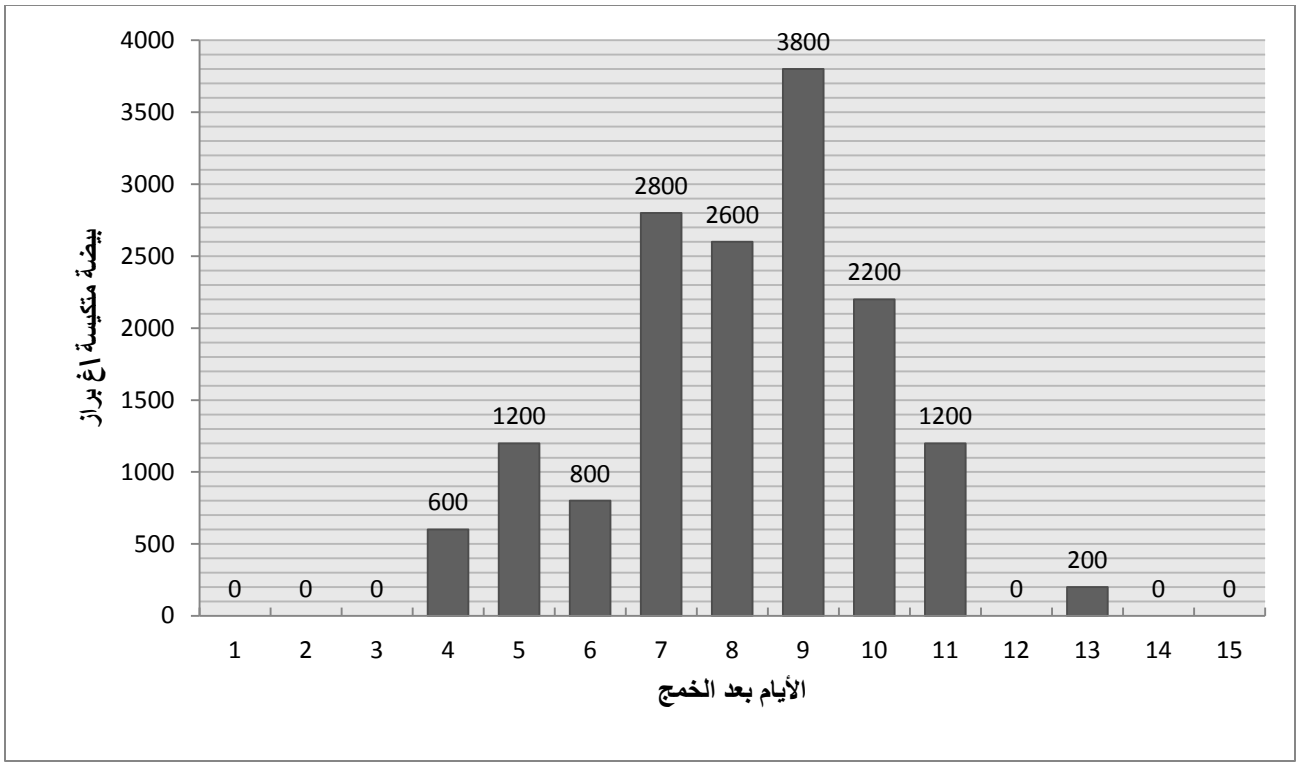
ومن خلال الفحوصات سُجِّل بدء إطراح البيوض المتكيسة وعند كل الحيوانات في المجموعة المثبطة مناعياً في اليوم الثالث وبمتوسط قدره 22800 بيضة متكيسة/غ براز (OPG=Oocyst per gram)، وقد بلغ الإطراح قمته في اليوم العاشر بمتوسط (OPG= 543200)، واستمر طرح الطفيلي إلى ما بعد اليوم الخامس عشر الذي كان المتوسط فيه (OPG= 60000) (المخطط 1).
أما في مجموعة الحيوانات غير المثبطة مناعياً فقد كان اليوم الرابع هو الأول الذي لوحظ فيه وجود البيوض المتكيسة في البراز المجموع، وعند حيوانين فقط وبمتوسط (OPG= 600)، وبلغ إطراح البيوض المتكيسة قمته في اليوم التاسع بمتوسط (OPG= 3800)، ولم يسجل وجود الطفيلي في براز أي من الحيوانات بعد

اليوم الثالث عشر(المخطط 2). ودلت مقارنة المتوسطات اليومية إحصائياً بين المجموعتين وفي جميع الأيام (الجدول 4–6) على وجود فروق معنوية واضحة جداً عند $p<0.01$.

وعلى العكس تماماً من حيوانات الهمستر، لم يلاحظ وجود البيوض المتكيسة إطلاقاً في براز الأرانب المخموجة سواء المثبطة مناعياً أم غير المثبطة، وذلك خلال الخمسة عشر يوماً التي تلت الخمج.



المخطط 1: متوسطات أعداد البيوض المتكيسة المطروحة في غرام البراز خلال أيام التجربة عند حيوانات الهمستر المثبطة مناعياً.



المخطط 2: متوسطات أعداد البيوض المتكيسة المطروحة في غرام البراز خلال أيام التجربة عند حيوانات الهمستر غير المثبطة مناعياً.

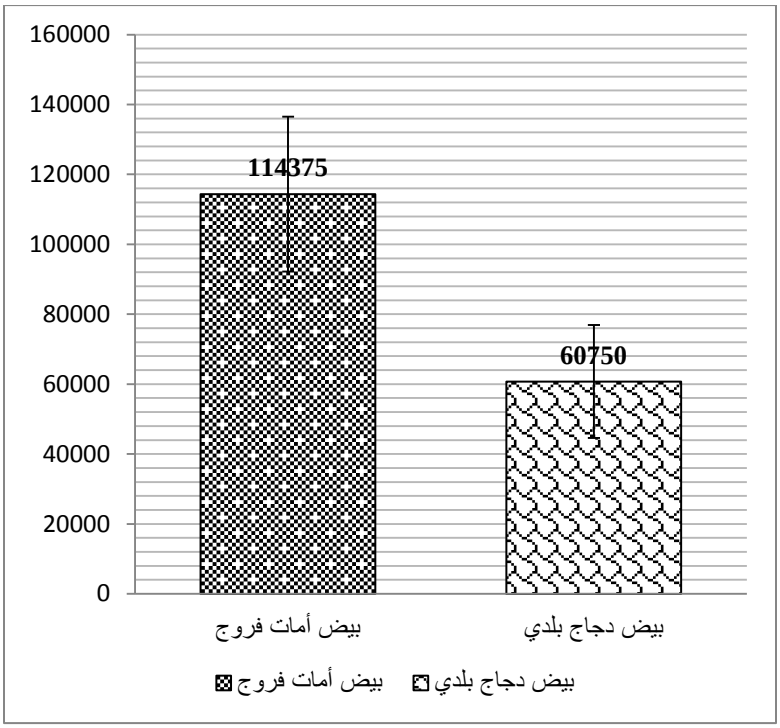
الجدول 4-6: متوسطات أعداد البيوض المتكيسة المطروحة في غرام البراز OPG خلال أيام التجربة عند حيوانات الهمستر المثبطة وغير المثبطة مناعياً.

الأيام بعد الخمج	متوسطات الـ OPG عند حيوانات الهمستر المثبطة مناعياً	متوسطات الـ OPG عند حيوانات الهمستر غير المثبطة مناعياً
1	0	0
2	0	0
3	22800	0
4	111400	600
5	134400	1200
6	153400	800
7	294000	2800
8	425000	2600
9	473000	2800
10	543200	2200
11	388600	1200
12	251400	0
13	179400	200
14	101400	0
15	60000	0

4-2-3- نتائج إخماجية البوغة الخفية الصغيرة في أجنة الدجاج:

Results of *Cryptosporidium parvum* Infectivity in Chicken Embryos

أما نتيجة دراسة تكاثر الطفيلي في أجنة بيض الدجاج، فقد تكاثرت البوغيات الخفية في جميع البيوض المحقونة، وبمتوسط بلغ في بيض أمات الفروج 114375 بيضة متكيسة/ml من السائل السقائي المشيمائي المجموع في اليوم 18 من عمر البيوض المخصبة، أما في بيض الدجاج البلدي فقد كان المتوسط 60750 بيضة متكيسة/ml من السائل السقائي المشيمائي (المخطط 3) علماً أنه سُحبت كمية تراوحت بين 5 و 7 ml من كل بيضة. وكان الفرق بين المتوسطين (بيض أمات الفروج وبيض الدجاج البلدي) معنوياً وبشكل واضح جداً عند $p<0.01$.



المخطط 3: متوسط عدد البيوض المتكيسة الموجودة في 1 ml من السائل السقائي المشيمائي

-الفصل الخامس-

المناقشة

Discussion

5-المناقشة Discussion

ستناقش أولاً نتائج فحوصاتِ العينات وتحديد الأنواع عند الإنسان والأبقار (عجول وأبقار بالغة) والدجاج كلٌ على حدة، ومن ثمّ نتائج تجارب الإكثار للبوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* عند الهمستر والأرانب وفي أجنة الدجاج.

5-1- نتائج فحص العينات وتحديد الأنواع:

Results of samples Examination and species detection

5-1-2- البوغيات الخفية عند الإنسان:Cryptosporidium in human

تختلف نسب انتشار البوغيات الخفية كمسببٍ للإسهال بين البلدان والمناطق عالمياً، وهي عموماً أقل من **خمسة بالمائة** في البلدان المتقدمة، وأكثر من ذلك في البلدان النامية وخاصة البلدان التي تتمتع بمناخ دافئ على مدار العام أو تلك التي تكون فيها إجراءات الوقاية والتصحح والاهتمام بسلامة مصادر مياه الشرب والغذاء ضعيفة عموماً (Abu samra, 2013; Caccio and Putignani, 2014; Molloy et al., 2010).

إن نسبة الإصابة بالبوغيات الخفية عند الأطفال المصابين بالإسهال والمسجَّلة في هذا العمل والتي بلغت **3.2%** تعد من النسب المنخفضة عالمياً، وهي قريبة جداً من النسبة التي سجلتها دراسة (إبراهيم، 2016) في دمشق والتي كانت 4.3% حيث شخصت الباحثة الإصابة عند 8 أطفال مصابين بالإسهال من أصل 186 عينة براز مفحوصة بطريقة اللطخة المباشرة الملونة بطريقة الصبغة الصامدة للحمض، علماً أن الدراسة لجأت أيضاً إلى استخدام طريقة الاستشراب المناعي ICT، حيث وجدت بنتيجتها الإصابة في 7 حالات فقط، وأشارت إلى أن طريقة الصباغة كانت أكثر حساسية وأقل تكلفةً، كما أتاحت الصباغة الصامدة للحمض القدرة على تصحيح الفحص المجهري الأولي المباشر لعينتين شخصتا على أنهما مصابتان بالفطور تبين بعد الصباغة أنهما يحتويان على البيوض المتكيسة للبوغة الخفية.

وبمقارنة نتائج هذه الدراسة مع الدراسات الأخرى الأقدم عند الإنسان والتي أنجزت في سورية منذ 17 عاماً (الأديب،1999 ; الكسار،1999) ودراسة (Ismail, 1995) منذ 19 عاماً، والتي كانت نسب الإصابة فيها 18.64%، و24.09%، و22.6% على الترتيب، فيلاحظ انخفاض النسبة المسجلة حالياً مقارنةً مع تلك الدراسات السابقة، الأمر الذي قد يعزى إلى تحسن نظام الصرف الصحي عموماً، وإلى عوامل أخرى كتضاؤل تربية الحيوانات في سورية بسبب الظروف الحالية إذ تعتبر الحيوانات وخاصة الأبقار من أهم

مصادر نشر هذا الطفيلي حيث يمكن أن يطرح العجل المصاب أعداد هائلة من البيوض المتكيسة قد تصل إلى (10^7 /غرام براز) (Fayer et al., 1998).
كما أن الاعتماد على العدسة ذات القوة التكبيرية X40 أثناء فحص الشرائح المحضرة والمصبوغة بالصبغات الصامدة للحمض بهدف الإسراع في فحص كامل اللطاخة المحضرة، وعدم استخدام العدسة الزيتية يؤدي إلى تشخيص الكثير من العينات التي تحتوي على أجسام ومكونات مشابهة باللون والقياس للبيوض المتكيسة على أنها إيجابية ومصابة بالطفيلي (إيجابية كاذبة False Positive) في حين هي على العكس من ذلك، الأمر الذي يساهم بتقديم نسب إصابة مرتفعة كاذبة في بعض الدراسات.

إن النسبة التي انتهت إليها نتيجة هذه الدراسة والتي بلغت 3.2% كانت أخفض من تلك التي سجلتها العديد من الأعمال التي أنجزت لدى الأطفال في الدول المجاورة ودول المنطقة، فمثلاً في مصر بلغت نسبة الإصابة 17% في العمل الذ أنجزه (Abdel-Messih et al., 2005)، كما بلغت 15.2% (في مصر أيضاً) اعتماداً على الصبغة الصامدة للحمض في دراسة (Ali and Ali, 2013)، وفضلت هذه الدراسة طريقة الصبغة الصامدة للحمض على عدة طرق تشخيصية أخرى كالإليزا والاستشراب المناعي.
وفي العراق كانت نسبة الإصابة عند الأطفال والمذكورة في دراسة (Kadhim, 2015) 18% وذلك اعتماداً على فحص العينات بالصبغة الصامدة للحمض.
أما النتائج التي خَلُصَتْ إليها دراسة (Saneian et al., 2010) في إيران فقد أظهرت انتشار البوغيات الخفية عند الأطفال المصابين بالإسهال بنسبة 4.6% وهي نسبة قريبة جداً من النسبة التي سجلت في سورية لدى (إبراهيم، 2016) وفي نتائج هذا العمل، وكذلك الأمر سجل العمل الذي قام به (Mojarad et al., 2010) في إيران نسبة إصابة بالبوغيات الخفية بلغت 2.5% عند الأطفال دون سن 12 عاماً.

إن نسب الإصابة في جميع الدراسات التي ذُكرت آنفاً والتي قُورنت مع نتائج هذا العمل اعتمدت على الطريقة ذاتها في تشخيص الإصابة، الأمر الذي يجعل المقارنة منطقية إلى حد ما، علماً أن الكثير من الدراسات الحديثة تعتمد أساساً على ربط البيوض المتكيسة وفصلها وتركيزها بالاعتماد على الفصل المناعي المغناطيسي Immunomagnetic Separation (IMS) الذي يتبع بتفاعل البوليميراز المتسلسل أو بمرحلة صباغة بإحدى الصبغات التألقية (Vohra et al., 2012; Xiao and Ryan, 2008)، وهذه الطرائق تعد أكثر حساسية ولاسيما في الكشف عن أعداد قلية جداً من البيوض المتكيسة.

ويمكن تفسير تطابق نتائج اللطخة المباشرة المصبوغة مع نتائج طريقة الفورمول–إيتر التركيزية في هذا العمل بأن كمية البراز التي يطرحها الطفل (أقل من خمس سنوات) يومياً تعتبر صغيرة ، ويكون تركيز الطفيليات فيها أكبر مما هو الحال عند البالغين أو الأطفال الأكبر سناً، وبالتالي فإن الكمية الصغيرة المستخدمة في اللطخة المباشرة تعتبر كافية غالباً لكشف الإصابة.

أظهرت نتائج الدراسة أن نوع البوغة الخفية الصغيرة هو الوحيد المسجل، ولكن هذا لا يعني عدم وجود أنواع أخرى عند الإنسان في سورية، وللحصول على صورة أوضح يتطلب دراسة أوسع تشمل كافة المحافظات السورية، وتشخيص عدد أكبر من الحالات الإيجابية عند الأطفال إضافة إلى المرضى ناقصي المناعة، ليطبق عليها تحليل RFLP .

ويجب التأكيد على أن النوع المشخص في هذا العمل يعد مشتركاً بين الإنسان والحيوان، ولكن أكدت الدراسات الحديثة التي اعتمدت سلسلة DNA الطفيلي المسؤول عن البروتين السكري GP60 على وجود تحت أنماط subtypes للبوغة الخفية الصغيرة *C. parvum*، يصيب بعضها الإنسان والأبقار في حين يصيب بعضها الآخر الإنسان فقط (Mohamed, 2014; Xiao, 2010) الأمر الذي قد يساهم في معرفة وفهم مصدر العدوى.

5–1–2– البوغيات الخفية عند العجول والأبقار البالغة: Cryptosporidium in calves and cows

تعد إصابة العجول الرضيعة بالبوغيات الخفية النقطة الأهم والتي تسبب الخسائر الأكبر الناجمة عن هذا الطفيلي عند الأبقار، وتتركز جهود الباحثين والكثير من الدراسات على محاولة وقاية الحيوانات خلال هذه المرحلة الحرجة من تأثيرات الإسهال والإقلال من حالات النفوق الناجمة عند الإصابة بالبوغيات الخفية والمسببات الجرثومية والفيروسية المرافقة.

وقد استهدفت هذه الدراسة الكشف عن طفيلي البوغة الخفية عند العجول المصابة بالإسهال وكانت نسبة الإصابة المسجلة نتيجة الفحص المجهري **<u>27.5%</u>** وهي أقل من تلك التي سجلها (قطرنجي، 1997) في سورية والتي كانت 47.7% لدى العجول المصابة بالإسهال، ويفسر هذا الفرق بين النسبتين بأن جميع عينات الدراسة التي أجراها قطرنجي كانت من عجول أعمارها دون الـ35 يوماً وعادة ما تكون العجول في هذه الأعمار أكثر حساسية وعرضة للإصابة من تلك الأكبر عمراً.

وتُظهِر الدراسات التي أجريت في مختلف دول العالم نسباً مختلفة للعجول الرضيعة التي تطرح بيوضاً متكيسة مع روثها تراوحت بين 5% و 93% (Robertson et al., 2014; Santín and Trout, 2008)، ويبين هنا على سبيل المثال لا الحصر دراستين إحادهما أنجزت في العراق (Kadhim, 2015) وسجلت

نسبة إصابة بلغت 31.42% في محافظة البصرة، وأخرى في إيران بلغت بنتيجنها نسبة الإصابة 23.3% (Keshavarz et al., 2009).

ولكن الأمر الذي يجب معرفته أن الدراسات المطولة والتي راقبت العجول الرضيعة في القطعان والمحطات المصابة أكدت على أن جميع العجول الموجودة سوف تصاب وتطرح البيوض المتكيسة قبل فطامها ومعظمها خلال الشهر الأول من حياتها (O'Handley et al., 1999; Santín and Trout, 2008).

أما نسب الإصابة المسجلة في الدراسات التي استهدفت عجولاً رضيعة عانت من الاسهال فقد تراوحت بين 25% و 49% (Imre et al., 2011; Plutzer and Karanis, 2007; Thompson et al., 2007) وذلك في الدراسات التي اعتمدت على الفحص المجهري في التشخيص.

وكما هو الحال في نتائج الكشف عن البيوض المتكيسة للبوغيات الخفية عند الأطفال فقد تطابقت نتائج اللطخة المباشرة المصبوغة والمحضرة من ناتج الإسهال عند العجول الرضيعة مع نتائج طريقة الفورمول–إيتر التركيزية، ويعود ذلك إلى أن العينات كانت قد جمعت أساساً من عجول رضيعة ومصابة بالإسهال والتي عادة ما تطرح بيوضاً متكيسة وبأعداد كبيرة في حال إصابتها الأمر الذي يسهل الكشف عن الإصابة اعتماداً على اللطخة المباشرة.

أما بالنسبة للأنواع المسجلة نتيجة تحليل RFLP فقد تم تحديد نوعٍ واحدٍ فقط في هذه الدراسة لدى العجول الرضيعة وهو البوغة الخفية الصغيرة *C.parvum* وتوافقت هذه النتيجة مع بعض الدراسات التي لم تسجل سوى البوغة الخفية الصغيرة عند العجول الرضيعة كدراسة (Maurya et al., 2013) في الهند و دراسة (Diaz et al., 2010) في إسبانيا. وهناك الكثير من الدراسات الأخرى التي أنجزت عند العجول الرضيعة وأكدت أن نوع البوغة الخفية الصغيرة كان الأكثر ملاحظة ولكن سجلت أيضاً وجود أنواع أخرى وبنسبٍ أقل كالبوغة الخفية البقرية والبوغة الخفية الريانية، والأندرسونية أحياناً (Robertson et al., 2014).

تضمن هذا العمل أيضاً جمع عدد من عينات الروث من أبقار بالغة وسليمة ظاهرياً، وسجل وجود البيوض المتكيسة للبوغيات الخفية في **<u>9.1%</u>** من العينات المجموعة، وهي نسبة قريبة من تلك المسجلة في معظم الدراسات التي أنجزت على الأبقار البالغة والتي تراوحت بين 4% و19%، وأغلبها كان بين 5% و9%(Castro-Hermida et al., 2011; Helmy et al., 2013; Khan et al., 2010; Silverlas et al., 2010; Smith et al., 2010).

وسجل وجود نوع واحد من البوغيات الخفية عند الأبقار البالغة هو البوغة الخفية الأندرسونية *C.andersoni* الذي يستوطن المنفحة ويتسبب في الإقلال من إنتاج الحليب من دون أعراض مرضية ظاهرة وواضحة ومن دون حدوث إسهال لدى الحيوانات المصابة. ويعد هذا النوع الأكثر انتشاراً عند الأبقار

البالغة إلا أن معظم الدراسات المشابهة لهذه الدراسة والتي حددت الأنواع الموجودة عند الأبقار البالغة سجلت وجود عدة أنواع أخرى وهي البوغة الخفية البقرية، والبوغة الخفية الريانية، وفي حالات نادرة البوغة الخفية الصغيرة (Robertson et al., 2014; Santin, 2013; Santín and Trout, 2008; Santin and Zarlenga, 2009).

5-1-3- البوغيات الخفية عند دجاج اللحم: Cryptosporidium in broiler chicken

أثبتت طريقة الفورمول-إيتر التركيزية فعالية في الكشف عن طفيلي البوغة الخفية عند الدجاج مقارنة مع اللطخة المباشرة، إذ تم الكشف عن البيوض المتكيسة في **9.9%** (11 قطيعاً) من القطعان المفحوصة اعتماداً على الطريقة التركيزية، و 8.1% فقط (9 قطعان) نتيجة فحص العينات بوساطة اللطخة المباشرة.

وتأتي أهمية الطريقة التركيزية من أن البوغة الخفية البيلية *C.baileyi* والتي تعد الأهم عند الدجاج تصيب الجهاز التنفسي أساساً وبالتالي فإن جزءاً لا بأس به من البيوض المتكيسة لن يخرج مع زرق الطائر بل سيطرح مع المفرزات التنفسية والعطاس مباشرة إلى الوسط الخارجي الأمر الذي يقلل الأعداد الموجودة في الزرق.

إن النسبة المسجلة في هذا العمل أعلى من تلك التي سجلها (درويش، 2016) لدى دجاج اللحم والتي بلغت عنده 4.89%، ولعل هذا الفارق يعود إلى اختلاف عدد العينات المجموعة ومصدرها، وللحصول على نتائج أكثر دقة عن انتشار هذا الطفيلي لابد من إجراء دراسة موسعة شاملة تأخذ بالحسبان كثافة التربية في كل محافظة من محافظات القطر وأصول وقواعد جمع العينات في الدراسات الوبائية.

وردت في المقالات العلمية العديد من النتائج والنسب التي قاربت النسبة التي سجلتها هذه الدراسة مثل (Wang et al., 2014; Wang et al., 2010) إذ كانت 8.9% و 9.89% على الترتيب، وفي بعضها الآخر كانت النسب أعلى مما هو عليه الحال في هذا العمل كدراسة (Baroudi et al., 2013) في الجزائر والتي سجلت نسبة لوجود الطفيلي في أمعاء الطيور بلغت 34% حيث اعتمدت الدراسة على الطرائق المجهرية المباشرة والجزيئية في الكشف عن البوغيات الخفية.

لكن النسب التي سجلتها الدراسات (القديمة عموماً) التي اعتمدت فقط على الفحص المجهري لمقاطع نسيجية من الأمعاء والرغامى والقصبات وصرة فاريشيوس كانت أعلى من نتائج هذه الدراسة وتراوحت بين 24% و41% (Goodwin et al., 1996; Ley et al., 1988; Papadopoulou et al., 1987)، وكذلك الأمر بالنسبة للدراسة التي قام بها (وسوف، 2008) على الدجاج البياض والأمات ودجاج اللحم إذ سجل نسبة بلغت 34.28%، ويمكن تعليل هذه النسب بالنوعية المنخفضة لهذه الطرائق المعتمدة على رؤية أجسام

كروية أو بيضية ملتصقة على سطوح الظهارات في المقطع النسيجي والتي من الممكن أن تكون بقايا ورواسب من الأصبغة المستخدمة أو شوائب وقد تقود إلى تشخيص خاطىء.

لقد أظهرت نتائج هذه الدراسة أن نوع البوغة الخفية البيلية *C.baileyi* هو الأهم عند دجاج اللحم إذ وجد في 9 عينات من أصل 11 عينة إيجابية لوجود الطفيلي المدروس، في حين أظهر تحليل RFLP للعينتين المتبقين نوعاً ذو شاكلة غير معروفة Unknown profile.

إن تأكيد وجود البوغة الخفية البيلية في معظم العينات الإيجابية له دلالة هامة باعتبار أن هذا النوع يستوطن المسالك التنفسية وجراب فابريشيوس الأمر الذي يجب أن يدخل في حسبان الأطباء البيطريين والمهتمين بمجال تربية الدجاج وذلك لما قد يسببه هذا النوع من أعراض تنفسية، وأذيات في الجراب قد تؤدي إلى خسائر كبيرة .

لدى استعراض شاكلة تحليل RFLP غير المعروفة التي شوهدت في عينتين جمعتا من قطيعين متجاورين لوحظ تشابهما إلى حدٍ كبيرٍ مع شاكلة البوغة الخفية الصغيرة *C.parvum* ومع النمط البطي(عند البط) Duck genotype(Feng et al., 2007; Xiao and Ryan, 2008; Xiao et al., 1999b)،إلا أن هذين النوعين لم يشاهدا أبداً عند الدجاج، علماً أن الدراسات القديمة وقبل الاعتماد على الطرائق الجزيئية قد ذكرت عزل البوغة الخفية الصغيرة من الدجاج وقد تغيرت هذه المعطيات جذرياً في وقتنا الراهن (Nakamura and Meireles, 2015).

5-1-4- مقارنة طريقة الفحص المجهري مع تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش المستخدم:
Comparison of microscopic examination with nested-PCR test

لدى استعراض ومقارنة نتائج الفحص المجهري المباشر مع نتائج تفاعل البوليميراز المعشش الذي أنجز في هذه الدراسة تبين أن الطريقة المجهرية كانت أكثر كفاءة في تشخيص الإصابة، حيث أن تفاعل الـ Nested-PCR فَشِل في كشف الإصابة في عدد من العينات المجموعة من الدجاج والإنسان والتي كانت الإصابة قد شخصت فيها مسبقاً، مما جعل إعادة اختبار PCR وأحياناً إعادة استخلاص الـDNA عدة مرات ضرورة حتمية بهدف الوصول إلى النتيجة المرجوة وإنجاح تفاعل PCR المطلوب.

إن هذه النتيجة تتعارض مع معظم الدراسات والأدبيات والتي أشارت إلى أن الطرائق الجزيئية كانت أكثر حساسية من طرائق الفحص المجهري التي يمكنها كشف وجود أعداد قليلة جداً من البيوض المتكيسة في العينة المفحوصة (Helmy et al., 2013; Mohamed, 2014; Vohra et al., 2012) .

ومن الممكن تفسير وتعليل هذه النقطة من خلال عدة أمور، وأولها نوعية العتائد المستخدمة في استخلاص الـDNA ، حيث تم الاعتماد على عتيدة **NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany)**

والتي ذكرت إحدى المقالات (Mary et al., 2013) أنها كانت ذات كفاءة عالية في استخلاص المادة الوراثية للبوغيات الخفية من العينات البرازية، علماً أنها مخصصة أساساً لاستخلاص الـ DNA من الأنسجة، وقد تم إجراء بعض التعديلات على مراحل الاستخلاص وفقاً للتعليمات المرفقة مع العتيدة لتتلاءم مع العينات البرازية.

تعتمد معظم الدراسات في استخلاص الـDNA على عتائد تجارية خاصة بالمواد البرازية تحتوي على إضافات خاصة تتفاعل مع العديد من المواد البرازية التي قد تتداخل مع عملية الاستخلاص أو تثبط تفاعل الـ PCR إذ تحتوي المواد البرازية على الكثير من المركبات المثبطة لإنزيم الـ Taq كالبيليروبين Bilirubin وأملاح الصفراء Bile salts وعديدات السكريد المعقدة Complex polysaccharides .

كما أن حفظ العينات بالفورمالين يزيد من صعوبة عملية الاستخلاص ومن احتمالية حدوث تثبيط تفاعل الـPCR كما أشارت بعض المصادر (Smith, 2008; Vohra et al., 2012).

إن استخدام طريقة الفصل المناعي المغناطيسي IMS للبيوض المتكيسة من قبل العديد من الباحثين قبل استخلاص المادة الوراثية يرفع من كفاءة الاختبارات الجزيئية بمقدار 1000 ضعف (Xiao and Ryan, 2008)، ونظراً لارتفاع سعر هذه العتائد يمكن الاستعاضة عنها بطرائق تركيزية أبسط وتساعد في تحسين مردود استخلاص الـDNA وبنسبة مقبولة كطريقة التعويم السكري والتعويم الملحي على أن يكون الثقل (الوزن) النوعي Specific gravity للمحلول يتراوح بين 1.12 و 1.2 .

5-1-5- الإصابة بالطفيليات الأوالي في العينات المجموعة من الأطفال:

لم تكن البوغة الخفية الطفيلي الأكثر انتشاراً بين الأطفال المصابين بالإسهال، إذ احتلت الكيسة الأريمية البشرية المرتبة الأولى من حيث عدد الحالات التي سجل وجودها فيها وبلغت 27 عينة (الجدول 4-3).

وكان طفيلي الجياردية في المرتبة الثانية حيث لوحظ وجوده في 18 عينة، والبوغة الخفية في المرتبة الثالثة إذ تم الكشف عن بيوضها المتكيسة في 7 عينات.

وتعد الكيسات الأريمية البشرية قليلة الإمراضية وتلاحظ في كثيرٍ من الأحيان لدى أشخاصٍ سليمين ولا يعانون من أية أعراض أو إسهالات، وعلى العكس منها تعد الجياردية سبباً رئيساً للإسهالات عند الإنسان وفي مختلف الفئات العمرية، وهذا ما يدل على أن طفيلي الجياردية هو الطفيلي الأهم المسبب للإسهال حالياً في سورية، بالرغم من الانتشار الواسع للكيسة الأريمية البشرية.

ويشار في هذا المجال إلى أنه قد أنجزت مؤخراً دراستان هامتان أكدتا على أهمية الجياردية في سورية واعتمدتا على الطرائق الجزيئية في تصنيف الطفيلي وتنميطه (Skhal et al., 2017; Skhal et al., 2016).
وبالنظر إلى دراسات أخرى في سورية فقد توافقت نسب انتشار الطفيليات المسجلة في هذا العمل مع تلك الدراسات (الكفري و اسماعيل،2008 ; الكفري واسماعيل،2014 وابراهيم،2016) حيث أكدت على الانتشار الواسع للكيسة الأريمية البشرية والجياردية اللمبليّة والتي كانت أهم الطفيليات المعوية الممرضة.

5-2 - إخماجية البوغة الخفية الصغيرة عند الهمستر السوري والأرانب وفي أجنة الدجاج: *Cryptosporidium parvum* Infectivity in Syrian Hamster, Rabbit and Chicken Embryos

اهتمت كثير من الدراسات والمراكز البحثية خلال السنوات الماضية بإكثار الطفيلي وتنميته بهدف دراسته وفهمه ودراسة المركبات الدوائية وتأثيراتها وتجريبها في علاج البوغيات الخفية عند الإنسان والحيوان، ولجأت لتحقيق ذلك إلى الأوســـاط والمزارع الخلوية المختلفة (Gasser and O'Donoghue, 1999; Hijjawi et al., 2004)، وحققت تجارب إكثار الطفيلي في الفئران الرضيعة والفئران التي تعاني من العوز المناعي المشترك الشديد SCID Mice نجاحاً، لكن من مساوئها أنها تؤدي إلى إنتاج أعداد قليلة من البيوض المتكيسة بالإضافة إلى صعوبة التعامل معها من حيث حساسيتها وضرورة توفير ظروف خاصة لتربيتها.
وتباينت نتائج خمج الفئران المثبطة مناعياً بأحد مركبات القشرانيات السكرية، أو بالأشعة السينية تبعاً لنوع وسلالة الفئران (Nagano-Koyashiki et al., 2013; Rasmussen and Healey, 1992) .
وتتميز حيوانات الهمستر(القداد) بسهولة تربيتها والتعامل معها وطرحها كمية مقبولة من البراز بالمقارنة مع ما تطرحه الفئران، وتوافقت نتائج هذا العمل مع ما توصلت إليه دراسات أخرى من حيث إصابة الهمستر السوري الذهبي وطرحة لأعداد جيدة من البيوض المتكيسة واستمرار طرح البيوض المتكيسة في المجموعة المثبطة مناعياً إلى ما بعد اليوم الخامس عشر من الخمج، إلا أن الأعداد المطروحة كانت أعلى كما في دراسة (Rossi et al., 1990) وقد يعود ذلك إلى عدة أسباب منها طريقة تثبيط الحيوانات مناعياً بالأشعة السينية التي رافقت إعطاء المركب الكورتيزوني، وكانت الجرعة الخامجة للحيوان الواحد 100000 بيضة متكيسة (الجرعة في هذا العمل كانت 10000 بيضة متكيسة)، كما أن عمر الحيوانات كان أكبر إذ تراوح وزنها بين 80 و 100 g في حين كانت 30-40 g في هذه الدراسة.

واستطاعت إحدى الدراسات (Hernandez et al., 1994) إكثار البوغة الخفية في الأرانب الأمر الذي يتعارض مع نتيجة هذه الدراسة، وربما يفسر هذا التباين باختلاف مصدر البوغة الخفية وذريتها إذ كان مصدرها بشرياً، في حين كان مصدرها في هذه الدراسة من العجول، كما أن اختلاف سلالة الأرانب المستخدمة قد يكون لها تأثيراً على تكاثر الطفيلي. حيث أشارت الدراسات الحديثة إلى أن تحديد تحت النمط subtype بوساطة سلسلة Sequencing أجزاء معينة من تسلسل DNA الطفيلي له بالغ الأهمية في تحديد مقدرة البوغة الخفية على التكاثر في الحيوانات المختلفة، إذ يوجد مثلاً العديد من تحت الأنماط تتبع لنوع البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* يستطيع بعضها خمج الإنسان والأبقار في حين تقتصر قدرة الأنماط الأخرى على إصابة الإنسان فقط (Helmy et al., 2013) .

من المثبت علمياً قدرة النوع *Cryptosporidium baileyi* على التكاثر في أجنة بيض الدجاج، بينما تباينت نتائج إكثار البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* تبعاً لسلالة الدجاج المنتجة للبيض، وأظهرت البوغة الخفية المعزولة في هذا العمل القدرة على التكاثر على الغشاء السقائي المشيمائي وفي جميع البيوض المخصبة المحقونة، ولكن لم يكن ممكناً الحصول إلّا على أعداد منخفضة نسبياً من السائل السقائي المشيمائي مقارنة مع ما هو الحال لدى الهمستر، ويفسر ذلك بأن البوغة الخفية الصغيرة تصيب أصلاً الثديات، بالإضافة إلى أن بعض المصادر أشارت إلى أن أغلب البيوض المتكيسة الناتجة تبقى ملتصقة بالغشاء السقائي المشيمائي ولا تنفصل عنه، بعكس النوع *Cryptosporidium baileyi*، الذي تنفصل بيوضه المتكيسة وتوجد بأعداد كبيرة في السائل السقائي المشيمائي (Current, 1990; Wunderlin et al., 1997).

وقد يعزى الفرق بين أعداد البيوض المتكيسة المسجلة في بيض أمات الفروج وبيض الدجاج البلدي، إلى عوامل وراثية واختلاف السلالة، وإلى الأضداد الأمية المنقولة داخل البيض والتي قد تؤدي دوراً متميزاً في ذلك، إذ يكون احتمال تعرض طيور الدجاج البلدي للطفيلي بحكم طريقة التربية أكبر وأكثر تكراراً من أمات الفروج.

-الفصل السادس-

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

6-الاستنتاجات والتوصيات Conclusion and Recommendations

6-1- الاستنتاجات: Conclusions

بعد استعراض نتائج هذا العمل ومناقشتها يمكن الوصول إلى عدد من الاستنتاجات الأساسية والرئيسة التي يمكن بيانها فيما يلي:

1-تشكل البوغيات الخفية أحد أهم المسببات المرضية للإسهال عند العجول الرضيعة في سورية إذ شخصت في 27.5% من العينات المجموعة.

2-شخص وجود البوغيات الخفية في روث الأبقار السليمة ظاهرياً بنسبة 9.1% مما يشير إلى أهمية هذا المسبب وانتشاره، الأمر الذي يؤدي وفق دراساتٍ كثيرة إلى خفض كمية الحليب المنتجة من الأبقار المصابة.

3-إن نوع البوغة الخفية الصغيرة *Cryptosporidium parvum* هو النوع الوحيد الذي تم كشفه عند العجول الرضيعة، والنوع *Cryptosporidium andersoni* الوحيد الذي تم تشخيصه عند الأبقار البالغة.

4- وجدت البيوض المتكيسة للبوغيات الخفية في 9.9% من عينات الزرق المجموعة من قطعان دجاج اللحم، التي عانت من أعراض هضمية أو تنفسية أو كليهما، مما يشير إلى أهمية هذا الطفيلي كعامل رئيس أو مساهم في تلك الأعراض.

5- سجل وجود نوع البوغة الخفية البيلية *C. baileyi* عند الدجاج بالإضافة إلى نوع آخر غير معروف.

6- أهمية البوغة الخفية البيلية *C. baileyi* في الإصابات التنفسية عند الدجاج والناجمة عن الخمج بها منفردة أو مع عوامل مرضية مشاركة.

7-وجد نوع البوغة الخفية الصغيرة (النوع الوحيد المشخص عند الإنسان في هذه الدراسة) في 3.2% من عينات البراز المجموعة من أطفال دون سن الخامسة ومصابين بالإسهال، وهي نسبة قريبة من النسب المسجلة في بلدان أخرى ولاسيما الدول المتقدمة.

8-كانت الجيارديا اللمبلّية هي الطفيلي الممرض الأكثر ملاحظة عند الأطفال المصابين بالإسهال وبنسبة 8.4%.

9-كانت نتائج طريقة اللطخة المباشرة المصبوغة بملون كينيون مطابقة لنتائج طريقة الفورمول-إيتر التركيزية لدي الأطفال والعجول، في حين كانت الطريقة التركيزية أكثر حساسية وذات فائدة عند تطبيقها على زرق الدجاج.

10- إن حيوانات الهمستر المثبطة مناعياً بفوسفات الديكساميثازون كانت الأفضل من حيث قدرة البوغة الخفية الصغيرة المعزولة من العجول في هذه الدراسة على التكاثر فيها، وذلك مقارنة مع حيوانات الهمستر غير المثبطة مناعياً ومع الأرانب وأجنة الدجاج.

11- لم تستطع البوغة الخفية الصغيرة المعزولة من العجول في هذه الدراسة التكاثر في الأرانب السليمة وكذلك في الأرانب المثبطة مناعياً.

12- استطاعت البوغة الخفية الصغيرة المعزولة من العجول في هذه الدراسة التكاثر في أجنة بيض الدجاج المخصب، وكانت الأعداد التي وجدت في بيض أحد سلالات الهجن التجارية لدجاج اللحم أكثر من الأعداد التي وجدت في بيض الدجاج البلدي.

13- كانت طريقة الفحص المباشر المجهرية باستخدام صبغة كينيون أكثر كفاءة في الكشف عن الطفيلي مقارنة مع تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش وذلك وفق طريقة استخلاص الـDNA وخطوات التفاعل المتبعة في هذا العمل.

6-2- التوصيات: Recommendations

1- نظراً للجهل والإهمال الكبير الملاحظ في المختبرات حول أهمية وكيفية تشخيص هذا الطفيلي، نوصي باعتماد اختبار اللطخة المباشرة الملونة بصبغة كينيون الصامدة للحمض في جميع المختبرات البشرية والبيطرية في سورية، وتطبيقها عند الأطفال والعجول المصابة بالإسهال، وعند قطعان الدواجن التي تعاني من أعراض تنفسية أو هضمية.

2- إجراء دراسات تهدف إلى تحديد تحت الأنماط subtypes لنوع البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* المعزولة في هذه الدراسة أو في الدراسات المستقبلية اعتماداً على سلسلة DNA الطفيلي الخاص بالمستضد GP60 .

3- استخدام حيوان الهمستر المثبط مناعياً في التجارب والدراسات التي تستهدف البوغة الخفية الصغيرة *C. parvum* واعتباره نموذجاً حيوانياً Animal Model ملائماً لإكثار هذا الطفيلي والحفاظ عليه في المختبرات.

4- نظراً لأهمية هذا الطفيلي في مزارع الأبقار في سورية وللمشاكل المرضية والاسهالات الناجمة عنه عند العجول الرضيعة وحالات النفوق، ولغياب دواء فعال مستخدم ضد داء البوغيات الخفية، فإنه لابد من اتباع الخطوات المبينة أدناه لضمان تطبيق إجراءات الوقاية والحماية من هذا المرض والتي أهمها:

- إعطاء السرسوب بعد الولادة مباشرة وبالكميات المناسبة
- تعقيم الأدوات المستخدمة في رعاية وارضاع العجول،
- الحد من عوامل الإجهاد للعجول حديثة الولادة،
- العزل المباشر للعجول المصابة عن السليمة.

5- إجراء دراسات أوسع عند الإنسان والأبقار والدجاج وتشمل كافة محافظات القطر العربي السوري ومدعمة بالطرائق الجزيئية.

-الفصل السابع-

ملخص باللغة العربية

Arabic Abstract

7-ملخص باللغة العربية: Arabic Abstract

استخدم في هذه الدراسة تحليل PCR-RFLP بهدف تنميط أنواع البوغيات الخفية جينياً لأول مرة في سورية عند الإنسان والأبقار والدجاج. حيث جمعت 437 عينة براز وروث، تضمت 213 عينة من أطفال مصابين بالإسهال دون الخمس سنوات، و69 عينة إسهال من العجول الرضيعة، و 44 عينة من أبقارٍ بالغة سليمة ظاهرياً، و111 عينة جمعت من قطعان دجاج اللحم.

فُحصَت جميع العينات المجموعة بدايةً باستخدام صبغة كينيون الصامدة للحمض لتحديد المصابة والإيجابية منها، ومن ثم طُبِّق اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش nested-PCR على 41 عينة كانت إيجابية نتيجة الفحص السابق (19 من العجول، و 4 من الأبقار البالغة، و11 من دجاج اللحم، و 7 من الأطفال)، واستهدف اختبار nested-PCR المورثة المسؤولة عن الـ RNA الريباسي في الوحيدة الصغرى عند البوغيات الخفية، وأُتبِعَ هذا الاختبار بتحليل تعدد أشكال أطوال الشدف المقتطعة RFLP اعتماداً على ثلاثة إنزيمات قطع للـDNA هي *Ssp* I, *Vsp* I, *Mbo* II .

وأظهرت النتائج وجود نوعٍ واحدٍ عند كلٍ من الأطفال والعجول الرضيعة هو البوغة الخفية الصغيرة *Cryptosporidium parvum* ، ونوع واحد عند الأبقار البالغة هو البوغة الخفية الأندرسونية *C. andersoni* ، في حين وجد نوع البوغة الخفية البيلية *C. baileyi* لدى دجاج اللحم بالإضافة إلى نوعٍ آخر أظهر شاكلةً Profile غير معروفة بعد تحليل RFLP وذلك مقارنة مع الأنواع المعروفة والتي تصيب الدجاج.

ولإتمام الخطوات التي أنجزت في هذا العمل لابد من إجراء دراسات أخرى أوسع وأعمق تتضمن وتستهدف عدد من المورثات الإضافية، وسلسلتها وتحديد تحت الأنماط للأنواع الموجودة في القطر العربي السوري.

وبالإضافة إلى ما سبق تم عزل البيوض المتكيّسة وتنقيتها من إحدى العينات المجموعة من عجلٍ رضيعٍ مصاب، وتم استخدامها في دراسة الخمج التجريبي للبوغة الخفية الصغيرة عند الهمستر السوري الذهبي بعمر 5 أسابيع، والأرانب بعمر (5–7) أسابيع، وفي أجنة بيضِ الدجاج البلدي وبيض أمات الفروج. قسمت كل من حيوانات الهمستر والأرانب إلى مجموعتين، ثُبِّطت إحدى المجموعتين لكلٍ من الهمستر والأرانب مناعياً باستخدام فوسفات الديكساميثازون، بينما لم تعط الأخرى أي مثبط مناعي، وأظهرت النتائج تكاثر الطفيلي في مجموعتي حيوانات الهمستر، في حين لم يسجل تكاثرها عند الارانب، وكانت أعداد البيوض المتكيسة في براز مجموعة حيوانات الهمستر المثبطة مناعياً أكبر، وبفرق معنوي واضح جداً $p<0.01$ مقارنة مع المجموعة الأخرى.

وتكاثرت البوغة الخفية الصغيرة في جميع البيوض المخصبة المحقونة (بيض الدجاج البلدي وبيض أمات الفروج) ضمن الكيس السقائي المشيمائي، وكانت أعدادها في السائل السقائي المشيمائي لبيض أمات الفروج بعد 7 أيام من الخمج، أكبر من تلك في بيض الدجاج البلدي وبفارق معنوي واضح جداً عند $p<0.01$.

يعد هذا العمل هو الأول الذي اعتمد على تحليل RFLP في تحديد نوع البوغة الخفية في سورية، والذي تم بنتيجته الكشف عن وجود البوغة الخفية الصغيرة، والبوغة الخفية الأندرسونية، والبوغة الخفية البيلية، وكانت حيوانات الهمستر بعمر خمسة أسابيع والمثبطة مناعياً الأكثر ملاءمة كحيوانات تجارب يستفاد منها في دراسات قادمة تستهدف هذا الطفيلي.

-الفصل الثامن-

المراجع

References

8-المراجع: References

1- ابراهيم، إيلين (2016): تحري الإصابة بالبوغيات الخفية في عينات البراز باختبار الاستشراب المناعي ICT، بحث علمي لنيل شهادة الماجستير في الطب المخبري، كلية الطب البشري، جامعة دمشق.

2- الأديب، غسان عبد الرحمن (1999): التحري عن البوغيات الخفية عند البالغين المصابين بإسهالات مزمنة وعند البالغين اللاعرضيين، بحث علمي لنيل شهادة الماجستير في علم الأحياء الدقيقة، كلية الطب البشري، جامعة دمشق.

3- الكسار، بسام ديب (1999): تحري البوغيات الخفية عند الأطفال دون السنة العاشرة للمصابين بإسهالات وعند الأطفال اللاعرضيين في السن نفسه، بحث علمي لنيل شهادة الماجستير في علم الأحياء الدقيقة، كلية الطب البشري، جامعة دمشق.

4- الكفري، عبير و اسماعيل، محمد طاهر (2008): التراجع الهائل للطفيليات المعوية البشرية وبخاصة الديدان في دمشق وريفها، دراسة تشخيصية في الفترة بين عامي 1998-2007، مجلة التشخيص المخبري، هيئة مخابر التحاليل الطبية السورية، المجلد 5، العدد 1 .

5- الكفري، عبير و اسماعيل، محمد طاهر (2014): دراسة مسحية للتبدلات التي طرأت على انتشار أنواع الطفيليات المعوية في سورية بين عامي 2006-2011 ، مجلة المجلس العربي للعلوم الصحية، المجلد 15، العدد 4، الصفحة 34-40.

6- الوسوف، واصف (2008): أهمية داء البوغيات الخفية في قطعان الدواجن السورية. مؤتمر الثروة الحيوانية في سوريا الواقع وآفاق التطوير، منشورات جامعة حلب، ص 158.

7- درويش ، ماهر (2016): التغيرات المرضية المرافقة لداء البوغيات الخفية عند دجاج اللحم في سورية. أطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، الجمهورية العربية السورية .

8- طبش ، عبد الحافظ (2016): التغيرات المرضية المرافقة لداء البوغيات الخفية وأثرها على الأداء الاستقلابي عند أغنام العواس. أطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، الجمهورية العربية السورية .

9- قطرنجي، محمد محسن (1997): دراسة عن مدى تواجد البوغيات الخفية في إسهالات العجول الرضيعة، مجلة جامعة البعث، المجلد 19، العدد 3، الصفحة 89-109 .

10-Abdel-Messih, I.A., Wierzba, T.F., Abu-Elyazeed, R., Ibrahim, A.F., Ahmed, S.F., Kamal, K., Sanders, J., Frenck, R., 2005. Diarrhea associated with Cryptosporidium parvum among young children of the Nile River Delta in Egypt. Journal of Tropical Pediatrics 51, 154-159.

11-Abrahamsen, M.S., Templeton, T.J., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Zhu, G., Lancto, C.A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, Cryptosporidium parvum. Science 304, 441-445.

12-Abu samra ،N., 2013. AN Epidemiological study of cryptosporidiosis at the wildlife/livestock/human interface in Mpumalanga province, south Africa. Ph.D. thesis, Fac. Vet. Sci., university of Pretoria

13-Agnamey, P., Sarfati, C., Pinel, C., Rabodoniriina, M., Kapel, N ،.Dutoit, E., Garnaud, C., Diouf, M., Garin, J.-F., Totet, A., 2011. Evaluation of four commercial rapid immunochromatographic assays for detection of Cryptosporidium antigens in stool samples: a blind multicenter trial. Journal of clinical microbiology1607.-1605 ،49

14-Ali, F.M., Ali, S.A.K., 2013. Cryptosporidiosis In Sulaimani Pediatric Teaching Hospital And Comparison Of Different Diagnostic Methods For Its Detection. European Scientific Journal 9.

15-Arrowood, M.J., 2002. In vitro cultivation of Cryptosporidium species. Clinical Microbiology Reviews 15, 390-400.

16-Arrowood, M.J., 2008. In Vitro Cultivation, In: Fayer, R., Xiao, C. (Eds.) Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 499-525.

17-Baroudi, D., Khelef, D., Goucem, R., Adjou, K.T., Adamu, H., Zhang, H., Xiao, L., 2013. Common occurrence of zoonotic pathogen Cryptosporidium meleagridis in broiler chickens and turkeys in Algeria. Veterinary parasitology 196, 334-340.

18-Barta, J.R., Thompson, R.C., 2006. What is Cryptosporidium? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. Trends in parasitology 22, 463-468.

19-Beeching, N., Gill, G., 2014. Lecture Notes: Tropical Medicine. John Wiley & Sons.

20-Blagburn, B.L., Lindsay, D.S., Giambrone, J.J., SUNDERMANN ،C.A., Hoerr, F.J., 1987. Experimental cryptosporidiosis in broiler chickens. Poultry Science 66, 442-449.

21-Blagburn, B.L., Lindsay, D.S., Hoerr, F.J., Atlas, A.L., Toivio-Kinnucan, M., 1990. Cryptosporidium sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (Staganoplura bella: Passeriformes, Estrildidae). Avian diseases 34, 1027-1030.

22-Blagburn, B.L., Soave, R., 1997. Prophylaxis and chemotherapy: human and animal. In: Fayer, R. (Ed.), Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. CRC Press, Florida, 111-128.

23-Cabada, M.M., White, A.C., Jr., 2010. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? Current opinion in infectious diseases 23, 494-499.

24-Caccio, S.M., Putignani, L., 2014. Epidemiology of human cryptosporidiosis ،In: Caccio, S.M., Widmer, G. (Eds.) Cryptosporidium: parasite and disease. Springer, pp. 43-79.

25-Campbell, G.A., Mutharasan, R., 2008. Near real-time detection of Cryptosporidium parvum oocyst by IgM-functionalized piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever biosensor. Biosensors & bioelectronics 23, 1039-1045.

26-Carreno, R.A., Martin, D.S., Barta, J.R., 1999. Cryptosporidium is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitology research 85, 899-904.

27-Castro-Hermida, J.A., Garcia-Presedo, I., Almeida, A., Gonzalez-Warleta, M., Correia Da Costa, J.M., Mezo, M., 2011. Cryptosporidium spp. and Giardia duodenalis in two areas of Galicia (NW Spain). The Science of the total environment 409, 2451-2459.

28-Certad, G., Benamrouz, S., Guyot, K., Mouray, A., Chassat, T., Flament, N., Delhaes, L., Coiteux, V., Delaire, B., Praet, M., Cuvelier, C., Gosset, P., Dei-Cas, E., Creusy ،C., 2012. Fulminant cryptosporidiosis after near-drowning: a human Cryptosporidium parvum strain implicated in invasive gastrointestinal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma in an experimental model. Appl Environ Microbiol 78, 1746-1751.

29-Certad, G., Creusy, C., Guyot, K., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Pinon, A., Sitja-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Praet, M., 2010a. Fulminant cryptosporidiosis associated with digestive adenocarcinoma in SCID mice infected with Cryptosporidium parvum TUM1 strain. International journal for parasitology 40, 1469-1475.

30-Certad, G., Creusy, C., Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Gantois, N., Mouray, A., Chassat, T., Flament, N., Fleurisse, L., Pinon, A., Delhaes, L., Dei-Cas, E., 2010b. Development of Cryptosporidium parvum-induced gastrointestinal neoplasia in severe combined immunodeficiency (SCID) mice: severity of lesions is correlated with infection intensity. The American journal of tropical medicine and hygiene 82, 257-265.

31-Chalmers, R.M., Katzer, F., 2013. Looking for Cryptosporidium: the application of advances in detection and diagnosis. Trends in parasitology 29, 237-251.

32-Chaskes, S., Austin, R., 2008. Stains for Light Microscopy, In: Goldman, E., Green, L.H. (Eds.) Practical handbook of microbiology. CRC Press, pp. 37-51.

33-Chen, X.M., Levine, S.A., Splinter, P.L., Tietz, P.S., Ganong, A.L., Jobin, C., Gores, G.J., Paya, C.V., LaRusso, N.F., 2001. Cryptosporidium parvum activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. Gastroenterology 120, 1774-1783.

34-Cheun, H.I., Chung, B.S., Ma, D.W., Goo, B.L., Cho, S.H., Ji, M.J., Lee, W.J., 2013. Development of a Diagnostic Kit to Detect Cryptosporidium parvum and Giardia lamblia. Osong public health and research perspectives 4151.-146 ،

35-Clode, P.L., Koh, W.H., Thompson, R.C., 2015. Life without a Host Cell: What is Cryptosporidium? Trends in parasitology 31, 614-624.

36-Costello, R. 2011. Electrolyte & Water Balance In Calves (Merrick Animal Nutrition, The Permormance Leader in Animal Nutrition).

37-Current, W.L., 1990. Techniques and laboratory maintenance of Cryptosporidium, In: Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R. (Eds.) Cryptosporidiosis of Man and Animals. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 31-49.

38-Current, W.L., Blagburn, B.L., 199 .0Cryptosporidium: infections in man and domesticated animals, In: Long, L.P. (Ed.) Coccidiosis of Man and Domestic Animals. . CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp. 155-186.

39-de Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters ،J.E., 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. International journal for parasitology 29, 1269-1287.

40-Diaz, P., Quilez, J., Chalmers, R.M., Panadero, R., Lopez, C., Sanchez-Acedo, C., Morrondo, P., Diez-Banos, P., 2010. Genotype and subtype analysis of Cryptosporidium isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). Parasitology 137, 1187-1193.

41-Fall, A., Thompson, R.C., Hobbs, R.P., Morgan-Ryan, U., 2003. Morphology is not a reliable tool for delineating species within Cryptosporidium. The Journal of parasitology 89, 399-402.

42-Fayer, R., 1994. Effect of high temperature on infectivity of Cryptosporidium parvum oocysts in water. Appl Environ Microbiol 60, 2732-2735.

42-Fayer, R., 2008. General Biology In: Fayer, R., Xiao, L) .Eds.) Cryptosporidium and cryptosporidiosis. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 1-42.

43-Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S., Zarlenga, D., 1998. Cryptosporidium parvum infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. International journal for parasitology 28, 49-56.

44-Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M., 2008. Cryptosporidium ryanae n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (Bos taurus). Veterinary parasitology 156, 191-198.

45-Fayer, R., Speer, C.A., Dubey, J.P., 1997. General biology of Cryptosporidium. In: Fayer,R. (Ed.),Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, CRC Press, Boca Raton, FL, 1-242.

46-Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V., Xiao, L., 2007. Wide geographic distribution of Cryptosporidium bovis and the deer-like genotype in bovines. Veterinary parasitology 144, 1-9.

47-Foster, D., Smith, G.W., 2009. Pathophysiology of diarrhea in calves. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 25, 13-36.

48-Gasser, R.B., O'Donoghue, P., 1999. Isolation, propagation and characterisation of Cryptosporidium. International journal for parasitology 29, 1379-1413.

49-Glaberman, S., Sulaiman, I.M., Bern, C., Limor, J., Peng, M.M., Morgan, U., Gilman, R., Lal, A.A., Xiao, L., 2001. A multilocus genotypic analysis of Cryptosporidium meleagridis. The Journal of eukaryotic microbiology Suppl, 19s-22s.

50-Goodwin, M.A., Brown, J., Resurreccion, R.S., Smith, J.A., 1996. Respiratory coccidiosis (Cryptosporidium baileyi) among northern Georgia broilers in one company. Avian diseases 40, 572-575.

51-Hadfield, S.J., Robinson, G., Elwin, K., Chalmers, R.M., 2011. Detection and differentiation of Cryptosporidium spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. Journal of clinical microbiology 49, 918-924.

52-Hajdusek, O., Ditrich, O., Slapeta, J., 2004. Molecular identification of Cryptosporidium spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. Veterinary parasitology 122, 183-192.

53-Helmy ،Y.A., Krucken, J., Nockler, K., von Samson-Himmelstjerna, G., Zessin, K.H., 2013. Molecular epidemiology of Cryptosporidium in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. Veterinary parasitology 193, 15-24.

54-Hernandez, J.R., Blasco, A.C ،.Sanchez, A.M.M., 1994. Experimental Cryptosporidiosis In Rabbits. Research and Reviews in Parasitology 54, 225-227.

55-Hijjawi, N., 2010. Cryptosporidium: new developments in cell culture. Exp Parasitol 124, 54-60.

56-Hijjawi, N., Estcourt, A., Yang, R., Monis, P., Ryan, U., 2010. Complete development and multiplication of Cryptosporidium hominis in cell-free culture. Veterinary parasitology 169, 29-36.

57-Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ng'anzo, M., Ryan, U.M., Olson, M.E., Cox, P.T., Monis, P.T., Thompson, R.C .2004 ،.Complete development of Cryptosporidium parvum in host cell-free culture. International journal for parasitology 34, 769-777.

58-Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ryan, U.M., Olson, M.E., Thompson, R.C., 2002. Successful in vitro cultivation of Cryptosporidium andersoni: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of Cryptosporidium. International journal for parasitology 32, 1719-1726.

59-Huang, L., Zhu, H., Zhang, S., Wang, R., Liu, L ،.Jian, F., Ning, C., Zhang, L., 2014. An in vitro model of infection of chicken embryos by Cryptosporidium baileyi. Exp Parasitol 147, 41-47.

60-Hunter, P.R., Hadfield, S.J., Wilkinson, D., Lake, I.R., Harrison, F., Chalmers, R.M., 2007. Subtypes of Cryptosporidium parvum in humans and disease risk. Emerging infectious diseases 13, 82.

61-Imboden, M., Schaefer, D.A., Bremel, R.D., Homan, E.J., Riggs, M.W., 2012. Antibody fusions reduce onset of experimental Cryptosporidium parvum infection in calves. Veterinary parasitology 188, 41-47.

62-Imre, K., Lobo, L.M., Matos, O., Popescu, C., Genchi, C., Darabus, G., 2011. Molecular characterisation of Cryptosporidium isolates from pre-weaned calves in Romania: is there an actual risk of zoonotic infections? Veterinary parasitology 181, 321-324.

63-Ismail, M.T., 1995. La Cryptosoridiose en Syrie. Nouvelle Scientifique de France et du Proche Orient. Juillet, 72-76.

64-Kadhim, H., 2015. Prevalence of Cryptosporidium in some risky groups at Basrah governorate. Master thesis, College of Veterinary Medicine , University of Basrah ،.

65-Kang, C.D., Cao, C., Lee, J., Choi, I.S., Kim, B.W., Sim, S.J., 2008. Surface plasmon resonance-based inhibition assay for real-time detection of Cryptosporidium parvum oocyst. Water research 42, 1693-1699.

66-Karanis, P., Aldeyarbi, H.M., 2011. Evolution of Cryptosporidium in vitro culture. International journal for parasitology 41, 1231-1242.

67-Keshavarz, A., Haghighi, A., Athari, A., Kazemi, B., Abadi, A., Nazemalhosseini Mojarad, E., 2009. Prevalence and molecular characterization of bovine Cryptosporidium in Qazvin province, Iran. Veterinary parasitology 160, 316-318.

68-Khan, S.M., Debnath, C., Pramanik, A.K., Xiao, L., Nozaki, T., Ganguly, S., 2010. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of Cryptosporidium from dairy cattle in West Bengal, India. Veterinary parasitology 171, 41-47.

69-Kim, C.W., 1987. Cryptosporidium sp.: experimental infection in Syrian golden hamsters. Experimental parasitology 63, 243-246.

70-Koh, W., Clode, P.L., Monis, P., Thompson, R.C., 2013. Multiplication of the waterborne pathogen Cryptosporidium parvum in an aquatic biofilm system. Parasites & vectors 6, 270.

71-Kvac, M., Havrdova, N., Hlaskova, L., Dankova, T., Kandera, J., Jezkova, J., Vitovec, J., Sak, B., Ortega, Y., Xiao, L., Modry, D., Chelladurai, J.R., Prantlova, V., McEvoy, J., 2016. Cryptosporidium proliferans n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and Biological Evidence of Cryptic Species within Gastric Cryptosporidium of Mammals. PloS one 11, e0147090.

71-Ley, D.H., Levy, M.G., Hunter, L., Corbett, W., Barnes, H.J., 1988. Cryptosporidia-positive rates of avian necropsy accessions determined by examination of auramine O-stained fecal smears. Avian diseases, 108-113.

72-Mac Kenzie, W.R., Hoxie ،N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., et al., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. The New England journal of medicine 331, 161-167.

73-Mary, C., Chapey, E., Dutoit, E., Guyot, K., Hasseine, L., Jeddi, F., Menotti, J., Paraud, C., Pomares, C., Rabodonirina, M., Rieux, A., Derouin, F., Network, A.C.N., 2013. Multicentric evaluation of a new real-time PCR assay for quantification of Cryptosporidium spp. and identification of Cryptosporidium parvum and Cryptosporidium hominis. Journal of clinical microbiology 51, 2556-2563.

74-Masuno, K., Yanai, T., Sakai, H., Satoh, M., Kai, C., Nakai, Y., 2013. Pathological features of Cryptosporidium andersoni-induced lesions in SCID mice. Exp Parasitol 134, 381-383.

75-Maurya, P.S., Rakesh, R.L., Pradeep, B., Kumar, S., Kundu, K., Garg, R., Ram, H., Kumar, A., Banerjee, P.S., 2013. Prevalence and risk factors associated with Cryptosporidium spp. infection in young domestic livestock in India. Tropical animal health and production 45, 941-946.

76-Mele, R., Gomez Morales, M.A., Tosini, F., Pozio, E., 2004. Cryptosporidium parvum at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. Infect Immun 72, 6061-6067.

77-Mohamed, Y.A.H.A., 2014. Epidemiological investigations on the public health significance of Cryptosporidium parasites in livestock and people in the Ismailia Canal Zone of Egypt. Freie Universität Berlin ،

78-Mojarad, E.N., Keshavarz, A., Taghipour, N., Haghighi, A., Kazemi, B., Athari, A., 2010. Genotyping of Cryptosporidium spp. in clinical samples: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C2 gene. Gastroenterology and Hepatology from bed to bench 4.

79-Molloy, S.F., Smith, H.V., Kirwan, P., Nichols, R.A., Asaolu, S.O., Connelly, L., Holland, C.V., 2010. Identification of a high diversity of Cryptosporidium species genotypes and subtypes in a pediatric population in Nigeria. The American journal of tropical medicine and hygiene 82, 608-613.

80-Moore, D.A., Atwill, E.R., Kirk, J.H., Brahmbhatt, D., Herrera Alonso, L., Hou, L., Singer, M.D., Miller, T.D., 2003. Prophylactic use of decoquinate for infections with Cryptosporidium parvum in experimentally challenged neonatal calves. Journal of the American Veterinary Medical Association 223, 839-845.

81-Morada, M., Lee, S., Gunther-Cummins, L., Weiss, L.M., Widmer, G., Tzipori, S., Yarlett, N., 2016. Continuous culture of Cryptosporidium parvum using hollow fiber technology. International journal for parasitology 46, 21-29.

82-Morgan, U.M., Monis, P.T., Xiao, L., Limor, J., Sulaiman, I., Raidal, S., O'Donoghue, P., Gasser, R., Murray, A., Fayer, R., Blagburn, B.L., Lal, A.A., Thompson, R.C., 2001. Molecular and phylogenetic characterisation of Cryptosporidium from birds. International journal for parasitology 31, 289-296.

83-Mosier, D.A., Cimon, K.Y., Kuhls, T.L., Oberst, R.D., Simons, K.R., 1997. Experimental cryptosporidiosis in adult and neonatal rabbits. Veterinary parasitology 69169.-163 ،

84-Nagano-Koyashiki, S., Matsubayashi, M., Kimata, I., Furuya, M., Tani, H., Sasai, K., 2013. Infectivity of Cryptosporidium andersoni Kawatabi type relative to the small number of oocysts in immunodeficient and immunocompetent neonatal and adult mice. Parasitology International 62, 109-111.

85-Nakamura, A.A., Meireles, M.V., 2015. Cryptosporidium infections in birds--a review. Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria 24, 253-267.

86-Ng, J.S., Eastwood, K., Walker, B., Durrheim, D.N., Massey, P.D., Porigneaux, P., Kemp, R., McKinnon, B., Laurie, K., Miller, D., Bramley, E., Ryan, U., 2012. Evidence of Cryptosporidium transmission between cattle and humans in northern New South Wales. Exp Parasitol 130, 437-441.

87-O'Handley, R.M., Cockwill, C., McAllister, T.A., Jelinski, M., Morck, D.W., Olson, M.E., 1999. Duration of naturally acquired giardiosis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. Journal of the American Veterinary Medical Association 214, 391-396.

88-Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R., DuPont, H.L., 1999. Virulence of three distinct Cryptosporidium parvum isolates for healthy adults. The Journal of infectious diseases 180, 1275-1281.

89-Papadopoulou, C., Xylouri, E., Zisides, N., 1987. Cryptosporidial infection in broiler chickens in Greece. Avian diseases 32, 842-843.

90-Petry, F., 2004. Structural analysis of Cryptosporidium parvum. Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada 10, 586-601.

91-Plutzer, J., Karanis, P., 2007. Genotype and subtype analyses of Cryptosporidium isolates from cattle in Hungary. Veterinary parasitology 146, 357-362.

92-Rasmussen, K.R., Healey, M.C., 1992. Experimental Cryptosporidium parvum infections in immunosuppressed adult mice. Infect Immun 60, 1648-1652.

93-Robertson, L.J., Björkman, C., Axén, C., Fayer, R .2014 ،.Cryptosporidiosis in farmed animals, In: Caccio, S.M., Widmer, G. (Eds.) Cryptosporidium: parasite and disease. Springer, pp. 149-235.

94-Robinson, T.J., Cebelinski, E.A., Taylor, C., Smith, K.E., 2010. Evaluation of the positive predictive value of rapid assays used by clinical laboratories in Minnesota for the diagnosis of cryptosporidiosis. Clinical Infectious Diseases 50, e53-e55.

95-Rosales, M.J., Cordon, G.P., Moreno, M.S., Sanchez, C.M., 2005. Extracellular like-gregarine stages of Cryptosporidium parvum. Acta tropica 95, 74-78.

96-Rossi, P., Pozio, E., Besse, M.G., Gomez Morales, M.A., La Rosa, G., 1990. Experimental cryptosporidiosis in hamsters. Journal of clinical microbiology 28, 356-357.

97-Ryan, U., Hijjawi, N., 2015. New developments in Cryptosporidium research. International journal for parasitology 45, 367-373.

98-Ryan, U., Paparini, A., Tong, K., Yang, R., Gibson-Kueh, S., O'Hara, A., Lymbery, A., Xiao, L., 2015. Cryptosporidium huwi n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (Poecilia reticulata). Exp Parasitol 150, 31-35.

99-Ryan, U., Zahedi, A., Paparini, A., 2016. Cryptosporidium in Humans and Animals-a One Health approach to prophylaxis. Parasite immunology.

100-Ryan, U.M., Xiao, L., 2008. Birds, In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.) Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 395–418.

101-Ryan, U.M., Xiao, L., 2014. Taxonomy and Molecular Taxonomy. In: Cacciò, S. M., Widmer, G. (Eds.), Cryptosporidium: Parasite and Disease. Springer, New York, USA., 1 22. -

102-Sachse, K., Frey, J., 2003. PCR detection of microbial pathogens, Vol 216. Springer Science & Business Media.

103-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, 343.

104-Santin, M., 2013. Clinical and subclinical infections with Cryptosporidium in animals. New Zealand veterinary journal 61, 1-10.

105-Santín, M., Trout, J.M., 2008. Livestock, In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds) .Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 451-472.

106-Santin, M., Zarlenga, D.S., 2009. A multiplex polymerase chain reaction assay to simultaneously distinguish Cryptosporidium species of veterinary and public health concern in cattle. Veterinary parasitology 166, 32-37.

107-Silverlas, C., Bjorkman, C., Egenvall, A., 2009. Systematic review and meta-analyses of the effects of halofuginone against calf cryptosporidiosis. Preventive veterinary medicine 91, 73-84.

108-Silverlas, C., Naslund, K., Bjorkman, C., Mattsson, J.G., 2010. Molecular characterisation of Cryptosporidium isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. Veterinary parasitology 169, 289-295.

109-Skhal, D., Aboualchamat, G ،.Al Mariri, A., Al Nahhas, S., 2017. Prevalence of Giardia duodenalis assemblages and sub-assemblages in symptomatic patients from Damascus city and its suburbs. Infection, Genetics and Evolution 47, 155-160.

110-Skhal, D., Aboualchamat, G., Al Nahhas, S., 201 .6Giardia duodenalis in Damascus, Syria: Identification of Giardia genotypes in a sample of human fecal isolates using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analyzing method. Acta tropica 154, 1-5.

111-Smith, H.V., 2008. Diagnostics, In: Xiao, C., Fayer, R. (Eds.) cryptosporidium and cryptosporidiosis. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 173-207.

112-Smith, H.V., Caccio, S.M., Cook, N., Nichols, R.A., Tait, A., 2007. Cryptosporidium and Giardia as foodborne zoonoses. Veterinary parasitology 149, 29-40.

113-Smith, H.V., Nichols, R.A., Grimason, A.M., 2005. Cryptosporidium excystation and invasion: getting to the guts of the matter. Trends in parasitology 21, 133-142.

114-Smith, R.P., Chalmers, R.M., Mueller-Doblies, D ،.Clifton-Hadley, F.A., Elwin, K., Watkins, J., Paiba, G.A., Hadfield, S.J., Giles, M., 2010. Investigation of farms linked to human patients with cryptosporidiosis in England and Wales. Preventive veterinary medicine 94, 9-17.

115-Stockdale, H.D., Spencer, J.A ،.Blagburn, B.L., 2008. Prophylaxis and Chemotherapy, In: Fayer, R., Xiao, C. (Eds.) Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 255-287.

116-Templeton, T.J., Enomoto, S., Chen, W.-J., Huang, C.-G., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Zhu, G., 2010. A genome-sequence survey for Ascogregarina taiwanensis supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a Gregarine and Cryptosporidium. Molecular biology and evolution 27, 235-248.

117-Thompson, H.P., Dooley, J.S., Kenny, J., McCoy, M., Lowery, C.J., Moore, J.E., Xiao, L., 2007. Genotypes and subtypes of Cryptosporidium spp. in neonatal calves in Northern Ireland. Parasitology research 100, 619-624.

118-Tumova, E., Skrivan, M., Marounek, M., Pavlasek, I., Ledvinka, Z., 2002. Performance and oocyst shedding in broiler chickens orally infected with Cryptosporidium baileyi and Cryptosporidium meleagridis. Avian diseases 46, 203-207.

119-Tyzzer, E., 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Experimental Biology and Medicine 5, 12-13.

120-Tzipori, S., Ward, H., 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes and infection / Institut Pasteur 4, 1047-1058.

121-Tzipori, S., Widmer, G., 2000. The biology of Cryptosporidium. Contributions to microbiology 6, 1-32.

122-Vohra, P., Sharma, M., Chaudary, U., 2012. A comprehensive review of diagnostic techniques for detection of Cryptosporidium parvum in stool samples. J Pharm 2, 15-26.

123-Wang, L., Xue, X., Li, J., Zhou, Q., Yu, Y., Du, A., 2014. Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. Parasite 21, 36.

124-Wang, R., Jian, F., Sun, Y., Hu, Q., Zhu, J., Wang, F., Ning, C., Zhang, L., Xiao, L., 2010. Large-scale survey of Cryptosporidium spp. in chickens and Pekin ducks (Anas platyrhynchos) in Henan, China: prevalence and molecular characterization. Avian pathology : journal of the W.V.P.A 39, 447-451.

125-Warren, C.A., Guerrant, R.L., 2008. Clinical Disease and Pathology, In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.) CRYPTOSPORIDIUM AND CRYPTOSPORIDIOSIS. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 235-253.

126-WHO, 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases: summary.

127-Widmer, G., Tzipori, S., 2008. Animal Models, In: fayer, R., Xiao, C. (Eds.) Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 485-497.

128-Wunderlin, E., Wild, P., Eckert, J., 199 .7Comparative reproduction of Cryptosporidium baileyi in embryonated eggs and in chickens. Parasitology research 83, 712-715.

129-Xiao, Ryan, U., 2008. Molecular Epidemiology, In: Xiao, C., Fayer, R. (Eds.) cryptosporidium and cryptosporidiosis. CRC Press ،Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 119-172.

130-Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Exp Parasitol 124, 80-89.

131-Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R., Lal, A.A., 1999a. Phylogenetic analysis of Cryptosporidium parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl Environ Microbiol 65, 1578-1583.

132-Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C., Fayer, R., Lal, A.A., 1999b. Genetic diversity within Cryptosporidium parvum and related Cryptosporidium species. Appl Environ Microbiol 65, 3386-3391.

133-Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L.S., Alves, J.M., Serrano, M.G., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A.J., 2004. The genome of Cryptosporidium hominis. Nature 431, 1107-1112.

hamster feces, but did not do in rabbits. The number of OPG (oocysts per gram) in hamsters feces was significantly higher in immunosuppressed group than the intact one ($p<0.01$).

Reproduction of *Cryptosporidium* also happened in all inoculated embryos inside chorioallantoic sac. And the number of oocysts which existed in the harvested chorioallantoic fluid after 7 days of infection was significantly higher in broiler breeder eggs than the rustic chicken eggs ($p<0.01$).

This work is the first in Syria which depended on RFLP analysis in identifying *Cryptosporidium* species, and its result confirmed presence of *Cryptosporidium parvum,C. andersoni, and C. baileyi* . five weeks old immunosuppressed hamster was the most appropriate animal model in the study, and may utilized in future studies targeting this parasite.

9-English Abstract: ملخص باللغة الإنكليزية

In this study, PCR-RFLP was used for the first time in Syria for genotyping of *Cryptosporidium* species from man, cattle and chickens. The total of 437 fecal samples included 213 from children with diarrhea (<5 years), 69 from pre-weaned calves with diarrhea, 44 from healthy asymptomatic cows, and 111 from broiler chicken farms. All samples were collected and examined with acid fast stain to detect the presence of *Cryptosporidium* oocysts in samples. Subsequently a nested-PCR test was performed on 41 positive samples (19 from calves, 4 from adult cows, 11 from chicken, and 7 from children) targeting SSU rRNA gene, and was followed by RFLP analysis using three restriction enzymes *Ssp*I, *Vsp*I and *Mbo*II.
Results showed that *Cryptosporidium parvum* was the only identified species in children and calves, *C. andersoni* in adult cows, and on the other hand *C. baileyi* was identified in broilers in addition to another species with unknown RFLP profile in comparison to those which have been described in chicken. Further studies using more genes are needed to sequence and detect subtypes of this parasite.

The oocysts from infected pre-weaned calf were isolated and purified, and used in studying the infectivity of *Cryptosporidium parvum* in 5 weeks old Syrian golden hamsters, (5-7) weeks old rabbits, and in chicken embryonated eggs form broiler breeder flock and from rustic chicken.
Both hamsters and rabbits were divided into two groups, one group injected with dexamethasone phosphate to be immunosuppressed, and the another group didn't receive any medication. Results showed that the parasite propagated and shed with

-الفصل التاسع-

ملخص باللغة الإنكليزية

English Abstract

Syrian Arab Republic
Hama University
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Microbiology

Isolation and Genotyping Of Cryptosporidium Species By PCR/RFLP Technique

Thesis Submitted for Degree of Ph.D. in Parasitology

By

Morshed Adnan Kassouha

Master Degree In Vet. Med. Sci.
(parasitology)

Under The Supervision Of

Prof. Dr. Abdulkarim AL-Khaled

Prof. of parasitology
Dep. of Microbiology, Faculty of Vet. Med., Hama University

2018