



جامعة الموصل
كلية العلوم

دراسة وبائية وجزئية لتشخيص طفيلي البويغيات الخبيثة *Cryptosporidium sp* في بعض مناطق محافظة دهوك

رسالة تقدم بها الطالب

محمد اسماعيل خليل إبراهيم الخليل

إلى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات درجة الماجستير في اختصاص

علوم الحياة / علم الحيوان

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة سينا عبد الله علي الجرجري



جامعة الموصل
كلية العلوم

دراسة وبائية وجزئية لتشخيص طفيلي البويغيات الخبيثة *Cryptosporidium sp* في بعض مناطق محافظة دهوك

رسالة تقدم بها الطالب

محمد اسماعيل خليل إبراهيم الخليل

إلى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات درجة الماجستير في اختصاص

علوم الحياة / علم الحيوان

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة سينا عبد الله علي الجرجري

قرار لجنة المناقشة

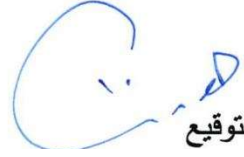
نشهد بأننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة، اطلعنا على الرسالة الموسومة " دراسة وبائية وجزئية لتشخيص طفيلي البويغيات الخبيثة *Cryptosporidium sp* في بعض مناطق محافظة دهوك " وناقشنا الطالب محمد اسماعيل خليل إبراهيم الخليل في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ ٢٠١٧/٤/٩ وكانت جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في اختصاص علوم الحياة/علم الحيوان.



التوقيع

أ.م.د. نجاح صبحي نايف
عضو

التاريخ / / ٢٠١٧



التوقيع

أ.م.د. هاني مال الله حمودي
رئيس اللجنة

التاريخ / / ٢٠١٧



التوقيع

أ.م.د. سينااء عبدالله علي
عضو (المشرف)

التاريخ / / ٢٠١٧



التوقيع

أ.م.د. كلاويز عبيد عثمان
عضو

التاريخ / / ٢٠١٧

قرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية العلوم بجلسته المنعقدة في / / ٢٠١٧
وقرر التوصية بمنحه شهادة الماجستير في علوم الحياة/علم الحيوان.

التوقيع

عميد كلية العلوم

الاسم: د. أنور مصطفى عزت الفيضي

التاريخ / / ٢٠١٧

التوقيع

مقرر مجلس الكلية

الاسم: د. أنور مصطفى عزت الفيضي

التاريخ / / ٢٠١٧

إقرار المشرف

أشهد بأن إعداد هذه الرسالة لطالب الماجستير (محمد اسماعيل خليل الخليل) قد جرى تحت إشرافي في كلية العلوم/قسم علوم الحياة ، وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة/علم الحيوان.

التوقيع: 

الأسم: أ.م.د. سيناء عبدالله

التاريخ: / / ٢٠١

إقرار المقوم اللغوي

أشهد بأن هذه الرسالة الموسومة "دراسة وبائية وجزيئية لتشخيص طفيلي البويغيات الخبيثة *Cryptosporidium sp* في بعض مناطق محافظة دهوك" قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير

التوقيع: 

الأسم: أ.م.د. صالح ويس

محمد

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل المشرف والمقوم اللغوي أشرح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع:

الأسم:

التاريخ: / / ٢٠١

إقرار رئيس القسم

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل المشرف والمقوم اللغوي ورئيس لجنة الدراسات العليا أشرح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع:

الأسم: د. محمد صالح

التاريخ: ٢٠١٧/٥/٢٧

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿وَقُلْ أَعْمَلُوا
فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ
وَالْمُؤْمِنُونَ﴾

بِسْمِ اللَّهِ
الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿سورة التوبة 105﴾

شُكْرٌ وَتَقْدِيرٌ

بِسْمِ اللَّهِ وَالصَّلَاةِ وَالسَّلَامِ عَلَى حَبِيبِنَا وَشَفِيعِنَا وَقُدُوتِنَا رَسُولِ اللَّهِ مُحَمَّدٍ وَعَلَى آلِهِ وَصَحْبِهِ وَمِنْ وَاوَاهِ. الْحَمْدُ لِلَّهِ كَمَا يَنْبَغِي لِجَلَالِ وَجْهِهِ وَعَظِيمِ سُلْطَانِهِ أَنْ وَفَّقَنِي وَيَسِّرَ لِي أَمْرِي فِي إِكْمَالِ هَذَا الْبَحْثِ الْمَتَوَاضِعِ وَأَعَانَنِي عَلَى تَحْقِيقِ هَدْفِي ، فَلهِ الْحَمْدُ وَالشُّكْرُ حَتَّى يَرْضَى .

أَتَقَدِّمُ بِشُكْرِي وَامْتِنَانِي لِمَشْرِفَتِي الْفَاضِلَةِ الْدَكْتُورَةِ (سِينَاءُ عَبْدِ اللَّهِ الْجُرْجَرِي) الَّتِي كَانَتْ خَيْرَ نَاصِحٍ لِي وَمَعِينٍ ، حَيْثُ لَمْ تَدْخُرْ جَهْدًا أَوْ تَوْجِيهًا أَوْ مَلاحِظَةً لِإِتِمَامِ هَذَا الْبَحْثِ ، فَاسْأَلُ اللَّهَ أَنْ يَجْزِيهَا عَنِّي وَعَنْ جَمِيعِ مَنْ عَلَّمْتَهُمْ حَرْفًا كُلَّ خَيْرٍ وَأَنْ يُوَفِّقَهَا وَيُبَارِكَ لَهَا فِي جُهودِهَا وَعَمْرِهَا خِدْمَةَ الْعِلْمِ وَالْمُتَعَلِّمِينَ .

كَمَا أَتَقَدِّمُ بِالشُّكْرِ الْجَزِيلِ لِعِمَادَةِ كَلِيَةِ الْعُلُومِ وَكَادِرِ قِسْمِ عُلُومِ الْحَيَاةِ رِئَاسَةً وَشُعْبًا لِإِتِحَاتِهِمْ لِي فِرْصَةَ إِكْمَالِ دِرَاسَةِ الْمَاجِسْتِيرِ وَجَمِيعِ مَنْ سَاهَمَ فِي تَسْهِيلِ أُمُورِ الطُّلَبَةِ لِإِتِمَامِ دِرَاسَتِهِمْ .

وَتَعْجِزُ كَلِمَاتِي وَمَفْرَدَاتِ اللُّغَةِ عَنِ التَّعْبِيرِ عَنِ خَالِصِ شُكْرِي وَتَقْدِيرِي وَاحْتِرَامِي لِمَنْ كَانَ لِي خَيْرَ سِنْدٍ فِي حَيَاتِي وَمِثْلًا أَعْلَى لِي (وَالدِّي رَحِمَكَ اللَّهُ) وَرَفِيقَةً دَرَبِهِ وَنَبْرَاسَ حَيَاتِي وَالشَّمْعَةَ الَّتِي تَتِيرُ طَرِيقِي (وَالدَّتِي الْغَالِيَةَ) حَفْظَكَ اللَّهُ مِنْ كُلِّ سُوءٍ وَبَارَكَ لِي فِي عَمْرِكَ . وَأَيْضًا أُخْصُّ بِشُكْرِي جَمِيعَ أُخُوْتِي وَأَخُوَاتِي وَزَمَلَائِي وَأَصْدِقَائِي وَكُلِّ مَنْ قَدَّمَ لِي يَدَ الْعَوْنِ .

وَلَا أُنْسِي بِشُكْرِي وَمَحَبَّتِي لِرَفِيقَةِ دَرَبِي وَشَرِيكَةِ حَيَاتِي (زَوْجَتِي الْعَزِيزَةَ) لِمَا تَحْمَلْتَهُ مَعِي مِنْ مِصَاعِبٍ فِي سَبِيلِ إِكْمَالِ دِرَاسَتِي .

وَالشُّكْرُ مُوَصُولٌ أَيْضًا لِأَسْتَاذِي الْفَاضِلِ (عَازِي رَمَضَانَ) وَأَخِيهِ الْأَسْتَاذِ (جَلَالِ رَمَضَانَ) وَالشَّيْخِ (سَرْدَارِ يَحْيَى) وَعَوَائِلِهِمُ الْكَرِيمَةَ لِرِعَايَتِهِمْ لِي وَلِعَائِلَتِي وَمِسَاهَمَتِهِمْ فِي التَّخْفِيفِ عَنِّي كَثِيرًا مِنْ صَعُوبَاتِ الظُّرُوفِ الْقَاسِيَةِ الَّتِي عَانِينَا مِنْهَا وَلَمْ يَبْخُلُوا فِي تَسْخِيرِ جَمِيعِ إِمْكَانِيَّاتِهِمْ فِي سَبِيلِ إِتِمَامِ هَذِهِ الرِّسَالَةِ ، فَشُكْرًا لَهُمْ وَاسْأَلُ اللَّهَ أَنْ يَعْينَنِي لِرَدِّ الْإِحْسَانِ بِالْإِحْسَانِ .

وَلَا يَسْعُنِي إِلَّا أَنْ أَتَقَدِّمَ بِخَالِصِ الشُّكْرِ وَالْعُرْفَانِ لِلدَكْتُورِ (أَكْرَمِ فَيِصَلِ الْعَبَّارِ) مَدِيرِ وَحْدَةِ التَّشْخِيسِ الْوَرَاثِيِّ فِي مَسْتَشْفَى زَيْنِ الدُّوَلِيِّ فِي أَرْبِيلَ لِكْرَمِهِ بِتَقْدِيمِ الْمَشُورَةِ الْعِلْمِيَّةِ الْقِيَمَةَ لِإِتِمَامِ الْجُزْءِ الْعَمَلِيِّ مِنَ الرِّسَالَةِ فَجَزَاهُ اللَّهُ خَيْرَ الْجَزَاءِ .

وَأَخِيرًا وَلَيْسَ آخِرًا أُخْصُّ بِالشُّكْرِ إِدَارَةَ وَكَادِرِ (مَخْتَبِرَاتِ GDL) فِي أَرْبِيلَ لِإِتِحَاتِهِمْ الْفِرْصَةَ لِي بِاسْتِخْدَامِ الْأَجْهَازَةِ الضَّرُورِيَّةِ وَالْحَدِيثَةِ لِإِنْجَازِ الْبَحْثِ وَفَتْحِ أَبْوَابِ مَخْتَبِرَاتِهِمْ لِي وَبِمَا تَتَمَتَّعُ بِهِ مِنْ إِمْكَانِيَّاتٍ مُتَقَدِّمَةٍ وَظُرُوفٍ مُلَائِمَةٍ لِإِجْرَاءِ التَّجَارِبِ الْعِلْمِيَّةِ .

فَاسْأَلُ اللَّهَ الْعَلِيِّ الْقَدِيرَ أَنْ يُوَفِّقَ الْجَمِيعَ لِمَا يَحِبُّ وَيَرْضَى .

الْبَاحِثُ

المستخلص بلغة الرسالة

تضمنت هذه الدراسة الكشف عن انتشار داء البويغات الخبيثة Cryptosporidiosis بين الأطفال المراجعين لمرز بردرش الصحي ومركز الخازر الصحي في قضاء بردرش في محافظة دهوك وبين البالغين المراجعين لمستشفى آزادي التعليمي في مدينة دهوك ومن كلا الجنسين وبأعمار مختلفة والذين يعانون من التهابات في المعدة والأمعاء , حيث تم الكشف باستخدام طريقة التصبغ بصبغة الزيل نلسن المحورة Modified Zeil- Neelsen stain وصبغتي الملاكايت الخضراء Malachite green oxalate والميثيلين الزرقاء Methylen Blue كصبغتين تفريقيتين , حيث لم يتم ملاحظة وجود فرق في القراءة بين المسحات المصبوغة بصبغة الملاكايت الخضراء وصبغة الميثيلين الزرقاء

تمت مقارنة نسبة الإصابة في العينات التي تم جمعها والبالغ عددها 77 عينة براز من حيث (الجنس , العمر , حالة البراز والفترة الزمنية التي أجري فيها البحث) , حيث أظهرت النتائج أن نسبة الإصابة الكلية بداء البويغات الخبيثة في العينات المفحوصة كانت 29.87% ومن كلا الجنسين . وقد تم تسجيل نسبة 29.72% للإصابة بين الأطفال الذكور ونسبة 30% بين الأطفال الإناث وبفارق معنوي ($P < 0.05$) . وكانت الإصابة محصورة فقط بين الأطفال الذين تراوحت أعمارهم بين (3 أشهر - 7 سنوات) ومن كلا الجنسين حيث كانت نسبة الإصابة للأطفال في الفئة العمرية (3 أشهر - سنتان) 42.42% لكلا الجنسين ونسبة 39.13% للأطفال بعمر (3 سنوات - 7 سنوات) لكلا الجنسين , حيث سُجلت إصابة واحدة بين الإناث بعمر 7 سنوات ونسبة 2.5% حيث كان عدد الإصابات يتناقص بتزايد العمر لذلك لم يتم تسجيل أي إصابة بالطفيلي في الأطفال والبالغين والذين تراوحت أعمارهم بين (8 سنوات - 33 سنة) . أظهرت النتائج حدوث الإصابة بنسبة 45.45% في عينات الإسهال بينما كانت نسبة الإصابة 18.18% في العينات ذات البراز الطبيعي ولم يكن هناك فرقا معنويا بين النسبتين. كما بينت النتائج حدوث أعلى نسبة إصابة في شهري أيار و حزيران ونسبة إصابة بلغت 45.45% - 50% على التوالي بينما كانت أقل نسبة إصابة بالطفيلي في شهري كانون الثاني وشباط حيث بلغت نسبة الإصابة 18.18% لكلا الشهرين وبفارق معنوي ($P < 0.05$) .

تم إجراء دراسة جزيئية للكشف عن وجود أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة في عينات البراز من خلال إجراء ملاءمة لظروف تفاعل البلمرة التقليدي Conventional PCR للحصول على أفضل الظروف لإجراء الفحص . حيث تمت عملية استخلاص الحمض النووي للأكياس باستخدام AccuPrep® Stool Genomic DNA Extraction kit وهو Kit تجاري عام يستخدم لاستخلاص الحمض النووي من جميع الأحياء المجهرية الموجودة في البراز , وقد تم إجراء عملية الاستخلاص تبعاً لتعليمات الشركة المجهزة مع إجراء مجموعتين من التحويرات, وقد قُسمت العينات إلى مجموعتين حيث كانت المجموعة الأولى تتضمن عينات محفوظة في محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم بينما شملت المجموعة الثانية لعينات محفوظة فقط في الثلجة وبدرجة حرارة 4°م ولفترة زمنية لا تتجاوز 1-2 أسبوع . أظهرت النتائج إن تراكيز عينات DNA المستخلصة من عينات البراز من المجموعة الأولى كانت منخفضة جداً مقارنة بتراكيز عينات DNA المستخلصة من عينات البراز من المجموعة الثانية .

وقد استخدمت وحدات جين الرنا الرايبوسومي Small subunit rRNA (SSU rRNA) gene كهدف مراد تضخيمه في تفاعل البلمرة التقليدي للحصول على Amplicon بحجم ~1325 قاعدة نروجينية . تم تحليل تسلسل الحمض النووي لثلاث عينات مختارة من نواتج تفاعل البلمرة والتي أظهرت نتيجة موجبة للمنطقة المستهدفة من الحمض النووي لطفيلي البويغات الخبيثة لمعرفة مدى تطابق تسلسل الحمض النووي للنواتج مع التسلسل الرئيسي للحمض النووي للطفيلي Cryptosporidium reference gene , حيث تمت عملية تنقية العينات وقراءة تسلسل الحمض النووي في شركة GeNet Bio في كوريا الجنوبية.

نموذج معلومات عينات الدراسة:

رقم العينة	الجنس	العمر	طبيعة العينة	تأريخ جمع العينة	مكان جمع العينة
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					

تعد أنواع طفيلي البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* sp من الأولي الطفيلية التابعة لشعبة معقدات القمة Apicomplexa والتي توجد بصورة عامة في المياه العالمية (Medema et al., 2006) , حيث تسبب هذه الطفيليات داء البويغات الخبيثة Cryptosporidiosis والمتمثل بالإصابة بالإسهال المائي الحاد أو الشحمي Steatorrheic مع مغص (Chen et al., 2001 ; Kosek et al., 2002) وقد يصاحبه غثيان وآم بطنية وفقدان شهية وأحياناً حمى خفيفة وغالباً ماينتهي المرض تلقائياً إلا عند ذوي النقص المناعي كمرضى الإيدز فيسبب نزلة معوية شديدة تشبه الكوليرا (Peterson, 1992 ; Warren and Guerrant, 2008) و تصيب هذه الطفيليات القناة المعدية المعوية Gastrointestinal tract لجميع أصناف الفقريات بما فيها الطيور والاسماك والثدييات والزواحف , حيث تكون أكياس هذه الطفيليات مقاومة للظروف البيئية (Fayer, 2004a ; Xiao et al., 2004a) .

تحدث أغلب الإصابات بهذا الطفيلي بين البشر Anthroponotic مع حدوث بعض الإصابات بالطفيلي عن طريق الحيوان Zoonotic , وقد سجلت إصابة القناة التنفسية بهذا الطفيلي في العديد من المضائف الفقرية (Ramirez et al., 2004 ; Caccio, 2005 ; Xiao, and Ryan. 2004b) .

سجلت الإصابة بطفيلي *C.parvum* في ستة قارات وشخصت في الأشخاص بأعمار ما بين 3 أيام و95 سنة , وتعد دول القارة الأوربية والولايات المتحدة الأمريكية في طليعة البلدان التي تقوم بمراقبة انتشار داء البويغات الخبيثة بشكل دوري (Semenza and Nichols, 2007 ; Painter et al., 2015) .

يعيش الطفيلي لفترة قصيرة في الأشخاص ذوي المناعة التامة , إذ أن المناعة الخلوية والخطية لها دور كبير في مقاومة الإصابة (Riggs, 2002) , وتزداد شدة الخطر عند إصابة الأشخاص ذوي المناعة القليلة كالأطفال الرضع والأشخاص الذين يعانون من سوء التغذية والأشخاص المصابين بالإيدز فضلاً عن الأشخاص الذين يتناولون بعض الأدوية المثبطة للمناعة Immunosuppressive therapy , كل ذلك يؤدي إلى الإصابة المزمنة بداء البويغات الخبيثة وبالتالي حصول الجفاف وسوء الامتصاص (Hunter and Nichols, 2002) .

إن آثار الإصابة تتنوع باختلاف أنواع البويغات الخبيثة وإن بعض أنواع هذه الطفيليات يصيب عدة أنواع من المضائف بينما البعض الآخر من الطفيليات عُرف عنه أنه يصيب نوعاً واحداً من المضائف , إذ أن خطورة وفترة الإصابة بالأنواع الممرضة للطفيلي تتأثر بالحالة المناعية للشخص المصاب أو الحيوان وإن الأفراد ذوي المناعة السوية Immunocompetent

individual ممكن أن تتراوح إصابتهم بهذا المرض بين المعتدل والحاد بينما الأفراد المنقوصي المناعة Immunocompromised individual ممكن أن يعانون من الإصابة المزمنة بالمرض وحتى الموت في بعض الأحيان. لقد تم تمييز 16 نوعاً من طفيليات البويغات الخبيثة وما يقارب ثلاثة أضعاف هذا الرقم تم تحديده من الأنماط الجينية للبويغات الخبيثة غير المسماة Unnamed Cryptosporidians وإن أغلب الدراسات في علوم : الأحياء , التشكل , الكيمياء الحياتية , المناعة , الأمراض , والفسلجة , أجريت على نوع واحد من هذه الطفيليات الا وهو طفيلي *C.parvum* وذلك للأسباب التالية:

1. لأهمية هذا النوع في مجال الطب والطب البيطري .
2. لانتشاره الجغرافي الواسع.
3. لأن هذا النوع يصيب عدة أنواع من المضائف , وينتج عدداً هائلاً من الأكياس , ولذلك يكون من السهل الحصول عليه للدراسة أكثر من الأنواع الأخرى من طفيليات البويغات الخبيثة.
4. كما أنه من الممكن تنمية وفحص هذا النوع من الطفيليات في المختبرات *In vitro* أو في الحيوانات المختبرية.
5. يضم هذا الطفيلي *C. parvum* بدوره 25 نمطاً وراثياً Genotype , إذ يعد كل من *C. bovis* , *C. hominis* نمط وراثي I ونمط وراثي B على التوالي لطفيلي *C.parvum* .

وبناءً على ذلك فإن المعلومات المستحصلة من التجارب على *C.parvum* في بعض الحالات تكون عامّة وممتدة للأنواع الأخرى لهذا الجنس, وبشكل ملحوظ فإن كل نوع ونمط جيني يمتلك صفات فردية تجعله مختلفاً عن بقية الأنواع (Fayer, 2008) .

ونظراً لأزدياد الإصابة بطفيلي البويغات الخبيثة في الإنسان والحيوان , دفع الباحثين لإجراء دراسات حول هذا الطفيلي ومنها دراسات حول وبائية داء الأبوغ الخبيثة في الإنسان والحيوان (العبيدي, 2006 ; Yacoub, 2014) , ودراسات في علاج داء البويغات الخبيثة في الفئران المختبرية (الجرجري, 2006 ; Mehran, 2017) , ودراسات في انتشار أكياس بيض الطفيلي في بعض مصادر المياه (Warid, 2010 ; Matavos-Aramyan et al., 2017) , كما أشارت النشريات العلمية إلى محدودية الدراسات حول طفيلي البويغات الخبيثة في محافظة دهوك , فضلاً عن عدم وجود دراسة وبائية في ضواحيها لاسيما في قضاء بردرش على عينات البراز وتحليل تسلسل القواعد النتروجينية للحمض النووي لطفيلي البويغات الخبيثة في عينة الـ DNA المستخدمة لذا تعد هذه الدراسة إضافة جديدة لدراسات الباحثين في القطر وعليه صممت

هذه الدراسة الحالية في وبائية وتشخيص طفيلي البويغات الخبيثة في بعض مناطق محافظة دهوك والتي تهدف إلى :

1. دراسة في وبائية طفيلي البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* sp والتحري عن أكياس بيض الطفيلي في بعض مناطق دهوك وخاصة قضاء بردرش .
2. تحديد الظروف المثلى لإجراء تفاعل البلمرة التقليدي conventional PCR من أجل تضخيم قطعة DNA محددة من الطفيلي باستخدام زوج من البوادئ تنتج Amplicon يكون حجمه 1325 قاعدة نيتروجينية تقريباً فضلاً عن إيجاد الحلول اللازمة للمعوقات التي تحدث خلالها .
3. قراءة تسلسل القواعد النيتروجينية DNA sequencing للعينة الموجبة الناتجة من تفاعل PCR لمعرفة مدى تطابق هذا التسلسل ومقارنته مع تسلسل القواعد النيتروجينية الكامل لطفيلي *Cryptosporidium* sp.

1.2 نبذة تاريخية Historical review:

يعد Ernest Edward Tyzzer (1907) أول من نشر تقريراً عن طفيلي كان قد شاهده في الغدد المعدية لأغلب الفئران ، حيث وصف المراحل الجنسية واللاجنسية لهذا الطفيلي وأن كل من هذه المراحل احتوت عُضوية تشبه Epimerite في Gregarines والتي تكون متخصصة للتعلق بخلايا المضيف . ولاحظ أيضاً الأكياس المطروحة في البراز ، وحدد الطفيلي كبوغيات غير معروفة الحالة التصنيفية وأطلق عليها اسم *Cryptosporidium muris* .

وصف Tyzzer في عام (1910) الطفيلي بتفاصيل أكثر واقترح اسم *Cryptosporidium* كاسم للجنس واسم *muris* كاسم للنوع . وأضاف فئران الفالز اليابانية Waltzing mice والفئران الإنكليزية English mice كمضائف وخمّن أن البوغيات الناتجة من الأكياس في الغدد المعدية ممكن أن تسبب إصابة ذاتية Autoinfection لهذه المضائف وأعتقد أن مراحل التطور الذاتية Endogenous developmental stages تكون خارج خلوية Extracellular بسبب الإمكانات المحدودة لمجهزه المركب ، وأن كل الجوانب الأخرى لوصفه الأصلي لدورة حياة طفيلي *C.muris* أثبتت لاحقاً بواسطة المجهر الإلكتروني .

أشار Tyzzer أن الظهور الأولي لتلك الكائنات الحية لوحظ في وقت سابق في الغدد المعدية للفئران من قبل Clark (1894-1895) حيث كانت نفس الأنواع التي كان يصدد وصفها ولكن ليس الطفيلي المسمى *Coccidium falciforme* الذي افترضه Jackson .

وفي عام 1912 وصف Tyzzer طفيلي *C.parvum* كنوع آخر جديد من خلال العدوى التجريبية للفئران المختبرية حيث تطور الطفيلي فيها وكانت أكياس *C.parvum* أصغر من الأكياس لنوع *C.muris* .

وفي عام 1929 ، فسّر Tyzzer بالرسم التوضيحي لكنه لم يعط وصفاً واضحاً لما أعتقد أنه المراحل التطورية لطفيلي *C.parvum* في ظهارة الأعور Cecal epithelium للدجاج . وكان قد سُمّي هذا الطفيلي لفترة من الزمن باسم *C.tyzzeri* تكريماً للعالم Tyzzer ، لكن هذا الاسم افتقد للمعلومات التصنيفية المفيدة لذلك أُعْتُبر اسماً خاطئاً . في أواخر العشرينات والثلاثينات من القرن العشرين أُعْتُبر Tyzzer الباحث البارز لجنس الطفيليات ذات الأهمية الاقتصادية كإمبريا *Eimeria* حيث وصف أنواعاً جديدة من الطفيليات مثل *E.acervulina* ، *E.maxima* ، و *E.mitis* والتي تسبب مرض الأكريات Coccidiosis في الدجاج وأنواع جديدة من *E.dispersa* ، *E.meleagridis* و *E.meleagrimitis* التي تصيب الديك الرومي .

وعلى مدى 48 عاماً وبعد أول منشور لـ Tyzzer , وبسبب أنه لم يكن طفيلي *Cryptosporidium* معروفاً بكونه ذي أهمية طبية أو إقتصادية أو ذي أهمية للطب البيطري , لم تكن هناك دراسات لاحقة على هذا الطفيلي ولذلك لم تكن هناك معلومات جديدة عن هذا الجنس من الطفيليات . وكان قد سُمي نوعان جديان من الطفيليات لكن هذه الأنواع كانت غير صحيحة التعريف Misidentified ولم تكن حتى من ضمن جنس *Cryptosporidium* (Wetzel,1938 ; Matschoultsky,1947) .

في عام 1955 , وبعد تقرير عن الأنواع الصحيحة والجديدة في الديك الرومي , أصبح طفيلي *C.meleagridis* أول أنواع طفيليات البويضات الخبيثة *Cryptosporidium* المرتبطة بالمرض والموت (Slavin,1955) . بقي الاهتمام قليلاً بهذه الطفيليات حتى أوائل عقد السبعينيات 1970 , حيث برز اهتماماً قليلاً بها بعد أن سُجلت طفيليات البويضات الخبيثة *Cryptosporidium* بكونها مرتبطة بحالات الإسهال التي أصابت الماشية (Pancieria et al.,1971 ; Meutin et al.,1974) .

في عام 1976 , سُجلت أول حالتين من الإصابة بداء البويضات الخبيثة Cryptosporidiosis في الإنسان (Holscher and Yardley, 1976 ; Meisel et al.,1976) , هذه الحالتان هما لطفل ذي 3 سنوات ومريض بعمر 39 سنة ذي مناعة مثبطة اشتركوا بالخلفيات التالية:

1. كل منهما عاش في مزرعة مع وجود المواشي .
 2. كل منهما امتلك كلباً .
 3. عانوا من إسهال شديد مائي .
 4. شُخصت إصابتهما بالفحص المجهرى لعينة من الخزعة المعوية .
- تم تشخيص هذه الحالات بواسطة الفحص المجهرى (بنوعيه الضوئي والألكتروني) لخُزَع من الصائم jejunal biopsy ولم يكن ممكناً في ذلك الوقت إمكانية التشخيص على مستوى الأنواع وُعزيت الإصابة إلى طفيليات البويضات الخبيثة *Cryptosporidium* sp .
- تم مشاهدة أكياس بيض الطفيلي في براز المضائف المُصابة به وقد اعتمد وجود هذه الأكياس في البراز في تشخيص الإصابة بداء البويضات الخبيثة Cryptosporidiosis (Pohlenz et al. 1978) . وسُجلت ثالث حالة بشرية في صبي يبلغ من العمر 9 سنوات مصاب بنقص غاماغلوبولين الدم الخلفي Congenital hypogammaglobulinemia (Lasser et al.,1979) .

أما الحالة الرابعة من الإصابة بداء البويغات الخبيثة فقد سُجلت في سبعينيات القرن الماضي وكانت لشخص بعمر 52 سنة ويعاني من نقص في الغلوبولين المناعي نوع (IgA) ومُثبِّط مناعياً لزرع الكلى ولم يُعرف عنه اتصاله بالحيوانات (Weisburger *et al.*, 1979) .

بالإضافة لهذه الحالات البشرية الأربعة , سُجلت الإصابة بداء البويغات الخبيثة Cryptosporidiosis خلال العقد الأول من القرن الحالي وظهر ما يقارب 40 منشوراً عن الماشية , الغنم , الخنازير , الخيول , الديك الرومي , الأرناب , القروء , الأفاعي وخنازير غينيا. في مجمل السنوات الأربع الأولى من القرن العشرين لم يتجاوز ما تم نشره من تقارير عن داء البويغات الخبيثة Cryptosporidiosis عن المائة تقرير , لكن في آخر سنة من ثمانينات القرن الماضي بلغت التقارير عن هذا الداء ما يُقارب 1200 تقرير . إن هذه الموجة من الاهتمام العالمي الواسع والدراسة على جنس البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* تُبعث بتقرير في عام 1982 من مراكز للسيطرة على المرض Centers for disease control(CDC) , وصف فيه 21 رجلاً من 6 مدن كبرى في الولايات المتحدة الأمريكية عانوا لمدة طويلة من الإسهال الشديد سبباً طفيليات البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* بالإضافة إلى إصابتهم بمتلازمة نقص المناعة المكتسب Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) (Anonymous, 1982).

إزداد الاهتمام مرة أخرى بشكل كبير بعد إصابة ما يقارب 403000 شخص بهذا الطفيلي عن طريق الماء في ولايات Milwaukee, Wisconsin في الولايات المتحدة الأمريكية (Mackenzie *et al.*, 1994) , لذلك فإن الرأي العام ووكالات الصحة العامة والجماعات الزراعية والجماعات البيئية ومُوردي مياه الشرب وآخرين أعربوا عن اهتمامهم بدراسة هذا المرض فبدأت الدراسات عن البيولوجيا الأساسية للبويغات الخبيثة *Cryptosporidium* مع التشديد على تطوير طرائق الكشف عن مرحلة الأكياس لهذا الطفيلي ومعالجة المرض .

قام (Zhang *et al.*, 2015) من جامعة Texas A&M في مركز الكلية بدراسة دورة حياة طفيلي *C.parvum* المعقدة في كل من المراحل الحرة (أي عندما يوجد الطفيلي في البيئة أو في القناة الهضمية للمضيف) وفي المراحل الداخل خلوية Intracellular stages في أعقاب غزو خلية المضيف , والتي خلالها يحتل الطفيلي حجرة متخصصة وهي فجوة Parasitophorous والتي يتم رسمها وتحديدها بواسطة الحدود المشتقة من خلية المضيف وتدعى غشاء فجوة (PVM) The parasitophorous vacuole membrane . ركز الباحثون في هذه الدراسة على أنزيم Lactate dehydrogenase (LDH) , وهو أنزيم أساسي لعملية التحلل السكري Glycolysis . حيث إن عملية التحلل السكري هي العملية الأيضية الوحيدة والتي من خلالها تقوم الكائنات الحية مثل طفيلي *C.parvum* بتوليد الطاقة اللازمة

لفعاليتها الحيوية . وجد الباحثون أن أنزيم (LDH) لطفيلي (*CpLDH*) موجود بداخل خلية الطفيلي خلال المراحل الحرة , لكنه ينتقل إلى غشاء فجوة Parasitophorous (PVM) خلال التطور الداخل الخلوي , مشيراً إلى مشاركة هذا الغشاء (PVM) في أيض طاقة الطفيلي , وعلى وجه التحديد في عملية تخمر اللاكتات Lactate fermentation . كما أوضح الباحثون أن هناك نوعين معروفين من مثبطات LDH وهي : Gossypol و FX11 والتي بإمكانها تثبيط فعالية كل من *CpLDH* و نمو الطفيلي في التجارب المختبرية عند تراكيز ميكرومولية منخفضة Low micromolar concentrations (Yu et al., 2001; Vander Jagt and Royer, 2000) .

إن Gossypol و FX11 هي مثبطات بروتين LDH في اللبائن كان قد تم اكتشافها كعلاج محتمل ضد الخلايا السرطانية وضد طفيلي *C. parvum* , والتي تعتمد بشكل كبير على عملية التحلل السكري الهوائية Aerobic glycolysis للبقاء على قيد الحياة (Doherty and Cleveland, 2013) .

من الممكن أن يعمل المثبط Gossypol على أهداف أخرى في الخلايا المضيفة بما في ذلك الأنزيمات التالية: Calcineurin , Telomerase , Steroid dehydrogenase , Ribonucleotide reductase arachidonate , Aromatase , phosphatase , Catechol-O-methyltransferase , Adenylate cyclase , lipoxygenases , Apurinic/aprimidinic endonuclease-1(APE1) , Phospholipase A2 الذي يعزز إختزال العامل 1 (Soderquist et al., 2014 ; Soderquist et al., 2013) . بينما أكتُشف FX11 مؤخراً أنه مثبط إنتقائي لجين LDH-A (Le et al., 2010 ; Rajeshkumar et al., 2015) .

وبسبب كون العديد من الخلايا السرطانية تعتمد بشكل أساسي على LDH-A , فإن التثبيط بواسطة FX11 يعدّ من الممكن تحقيقه وإنجازه وعلاج مقبول للأورام المعتمدة على LDH-A . وفي حالة خلايا HCT-8 , شائعة الاستخدام في دراسة الإصابة بطفيلي البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* في التجارب المختبرية , فإن mRNA لجين LDH-A أكبر بـ 5 أضعاف من mRNA جين LDH-B وبالتالي فإنه بإمكان المثبطات Gossypol و FX11 منع نمو طفيلي *C. parvum* في التجارب المختبرية ليس فقط عن طريق العمل المباشر على أنزيم LDH للطفيلي , لكن أيضاً عن طريق تغيير استقلاب الخلية المضيفة ومع هذا فإن ذلك يبدو مستبعداً كعلاج خلية المضيف بالمثبط Gossypol 16µM لمدة 24 ساعة حيث لم يكن له أي تأثير على نمو طفيلي *C. parvum* , مما يشير إلى أن التغييرات الفسيولوجية الناجمة بواسطة Gossypol تساهم فقط في الحد الأدنى لفعاليتها المضادة لطفيلي البويغات

الخبئية . بالإضافة لذلك فإن الباحثين لاحظوا أن الفعالية المضادة لطفيلي البويغات الخبئية Anti-Cryptosporidium activity لكل من Gossypol و FX11 عند استخدام خط الخلايا الأولى FHs74 Int primary cells والتي تكون أقل حساسية من الخلايا السرطانية لتثبيط فعالية أنزيم LDH . وبالمجمل تشير هذه الملاحظات إلى أن فعالية مكافحة طفيلي البويغات الخبئية لكل من المثبطات Gossypol و FX11 تكون إلى حد كبير نتيجة نشاطها المثبط ضد CpLDH , ومن المفهوم أن التثبيط النهائي في CpLDH كدواء هدف ممكن فقط أن يتحقق باستخدام الأدوات الوراثية كوسيلة حاسمة للجينات ذات الاهتمام في طفيليات البويغات الخبئية . وفي الآونة الأخيرة تم تسجيل أول تعديل وراثي ناجح لطفيلي *C.parvum* باستخدام CRISPR/Cas9 (Vinayak et al., 2015) .

وعلى الرغم من أن نظام Transfection ضروري لتكاثر الطفيليات في الفئران فإنه لا يزال يحتاج إلى مزيد من التطوير ليصبح تقنية روتينية , وأنه يبعث الأمل في أن CpLDH وأدوية مُستهدفة محتملة أخرى في طفيلي *C.parvum* يمكن التحقق من صحتها وراثياً في المستقبل القريب جداً . ومن الملاحظ أيضاً أن النشاطات المضادة لطفيليات البويغات الخبئية والمشاهدة للمثبطات Gossypol و FX11 في التجارب المختبرية ليست قوية بما فيه الكفاية لتطوير الأدوية من هذه المركبات المحدودة . ومع ذلك فإن البيانات الحالية جنباً إلى جنب مع حقيقة أن طفيلي *C.parvum* يعتمد على التحلل السكري لإنتاج ATP نتيجة لافتقاده لدورة كريس Krebs cycle وسلسلة الجهاز التنفسي المرتكزة على الساييتوكروم Cytochrome , تدعم فكرة أن CpLDH النوع البكتيري جدير بالاكشاف كهدف محتمل لتطوير علاجات مضادة لطفيليات البويغات الخبئية (Zhang et al., 2015).

2.2 التصنيف (Taxonomy):

Empire	: Eukaryota
Kingdom	: Protozoa
Phylum	: Apicomplexa
Class	: Coccidea
Order	: Eucoccidiorida
Family	: Cryptosporidiidae
Genus	: Cryptosporidium
Type species	: <i>Cryptosporidium parvum</i>

(Fayer, 2008).

كائنات أحادية الخلية Unicellular organisms (ابتدائيات) حقيقية النواة أي أن أغلب حمضها النووي (DNA) يكون ضمن النواة ومحاطاً بغشاء مزدوج كما أن جميع أفراد جنس البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* طفيليات داخل خلوية Intracellular وبعضها عوامل ممرضة وهي واحدة من ضمن أكثر من 300 جنس يتضمن 4800 نوع في شعبة معقدات القمة Apicomplexa وقد أصبح عشرة أضعاف هذا العدد بعد أن تم وصفها لاحقاً وأن أكثر من 150 نوعاً من اللبائن ومن ضمنها الإنسان , الطيور , الزواحف , البرمائيات والسماك عرضةً للتطفل من قبل أفراد جنس البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* وإن أغلب Apicomplexans ماعدا Eugregarines تملك دورة حياة معقدة تشتمل على مراحل جنسية ولاجنسية ينتج عنها Sporogony (تكاثر بوغي) (Fayer, 2008) وقد وجدت عضيات متخصصة في المراحل اللاجنسية المتحركة التي تقوم بعملية غزو خلايا المضيف , تضم هذه العضيات:

1. نُبيبات تحت الغلاف Subpellicular microtubules وهي مهمة للحركة.
2. المُعقد القمي Apical complex , يتألف من الحلقات القمية (الرأسية).
3. المخروط Conoid.
4. الخويطات Micronemes.
5. الخيوط القوسية Rhoptries .
6. حُبيبات كثيفة Dense granules.

جميع هذه الأعضاء تلعب دوراً مهماً في عملية اجتياح خلايا المضيف. وهذه الأجناس من الطفيليات تتطور في القناة المعوية للمعوية للفقرات وتمر بجميع مراحل حياتها في مضيف واحد مثل *Cyclospora* , *Isospora* , *Eimeria* والبويغات الخبيثة *Cryptosporidium* , وعادة ما يشار إلى هذه الأجناس باسم Coccidia (الأكريات) , أما الأكريات الأخرى التي تتطور في

القناة المعدية المعوية للفقرات والتي يتطلب إكمال نموها أن تكون لها القدرة على التطور خارج الأمعاء Extraintestinal development فقد أُشير لها بالأكريات المكونة للأكياس النسيجية Tissue cyst-forming coccidian , تضم هذه الأكريات : *Caryospora* , *Besnoitia* , *Toxoplasma* و *Sarcocystis* , وباستثناء *Toxoplasma* فإن أعضاء المجموعة الأخيرة تحتاج لمضيفين لإكمال دورة حياتها أحدهما مفترس والآخر مُفترَس (فريسة) , يصطلح على هذه المجموعة اسم طفيليات إجبارية متغايرة المضيف Obligatory heteroxenous parasites . بالرغم من أن العديد من الصفات الشكلية ودورة الحياة المشتركة بين نوع البويضات الخبيثة *Cryptosporidium* وجميع الأكريات *Coccidia* المذكورة آنفاً إلا أن بعض التحاليل الجزيئية أشارت إلى وجود علاقة وثيقة بين أنواع البويضات الخبيثة *Cryptosporidium* sp و Gregarines (Carreno et al.,1999).

وكذلك وضع التصنيف التطوري Phylogenetic analysis طفيليات البويضات الخبيثة Cryptosporidians مع طفيليات عديمة الحواجز Aseptate archigregarines , لكن لم يحدد فيما إذا كانوا قد تطورا أو أشقاء لـ Gregarine clade (Leander et al.,2003) .

3.2 أنواع طفيلي البويضات الخبيثة *Cryptosporidium* Species :

أثبتت العديد من الدراسات المُعتمدة على تحليل العلامات الوراثية المفردة أو المتعددة (Peng et al., 1997; Spano et al., 1998a) وجود مجموعتين فرعيتين مميزة وراثياً ضمن طفيلي *C.parvum* والتي تصيب البشر والمواشي ويرمز لأحدها بحرف H والأخرى حرف C أو تعرف بالنوع الأول والنوع الثاني Type 1 , Type 2 , وقد تم تأكيد هاتين المجموعتين في العديد من المختبرات وتم إثبات وجود دورتين متميزتين لانتقال داء البويضات الخبيثة للإنسان : دورة تشمل الإنسان والحيوانات المجترة zoonotic cycle والأخرى تضم الإنسان حصراً anthroponotic cycle .

وفي عام 2002 وعلى أساس تراكم مشاهدات الاختلافات الوراثية والبيولوجية تم اقتراح *C.hominis* كنوع جديد من طفيليات البويضات الخبيثة يصيب الإنسان حصراً (Morgan-Ryan et al. 2002) .

في عام 2006 كانت هناك محاولة لتوضيح تصنيف الأنواع , حيث اقترح Slapeta اسم *C.pestis* ليحل محل اسم *C.parvum* للأنواع الحيوانية المنتشرة في المواشي والتي أصبحت الأنواع الافتراضية للعديد من الدراسات المتعاقبة على داء البويضات الخبيثة Cryptosporidiosis في الإنسان واللبائن (Slapeta, 2006) .

أظهرت الزيادة في تطبيق تقنيات التتميط الجيني في الدراسات الاستقصائية الوبائية أن الغالبية العظمى (أكثر من 90%) من حالات إصابة الإنسان بداء البويغات الخبيثة كانت بسبب طفيلي *C. hominis* و *C. parvum* (Xiao, 2010). ومن الواضح الآن أن هناك أنواعاً أخرى تسبب العدوى بين البشر منها: *Cryptosporidium meleagridis* و في كثير من الأحيان *C. canis*, *C. felis*, *C. ubiquitum* و طفيلي *C. viatorum* وأنماط وراثية أخرى للبويغات الخبيثة غير معلومة الحالة التصنيفية. إن انتشار هذه الأنواع والأنماط الوراثية قليل الشيوع يختلف جغرافياً فمثلاً *C. meleagridis* وُجد أنه يكون شائعاً كطفيلي *C. parvum* لدى الأطفال في البيرو وتايلاند (Cama et al., 2008).

4.2 خصوصية المضيف Host specificity :-

لتحديد مجموعة المضائف الخاصة بطفيلي البويغات الخبيثة *Cryptosporidium*, يتم إعطاء أكياس بيض Oocysts التي يتم الحصول عليها من حيوانات من نوع واحد لحيوان من نوع آخر عن طريق الغذاء الحاوي على هذه البيوض, فإذا أكتملت دورة حياة الطفيلي داخل هذا المضيف غير الطبيعي وتم طرح الأوكياس بالبراز خارج المضيف والتي تُحدد وراثياً لتلك التي بدأت بالعدوى فيعدّ مضيفاً مناسباً للطفيلي وبذلك يتم توسيع مجموعة المضائف. تم تحديد طفيليات البويغات الخبيثة للطيور *C. baileyi* و *C. meleagridis* في كل من الأشخاص منقوصي المناعة والأشخاص الأصحاء (Ditrich et al., 1991 ; Pedraza-Diaz et al., 2000 ; Guyot et al., 2001 ; Xiao et al., 2001a ; Gatei et al., 2003). وكذلك تم وصف عدة أنواع فرعية من طفيلي *C. meleagridis* (Glberman et al., 2001).

إن طفيلي اللبائن *C. parvum* لا يُصيب البط أو الإوز لكنه يصيب الدجاج. وأضيفت تقارير متضاربة إلى الإرباك الحاصل بخصوص نطاق أنواع المضائف سريعة التأثير بطفيلي *C. parvum*, بينما دراسة واحدة فقط أشارت إلى أن أكياس بيض طفيلي *C. parvum* المأخوذة من الإنسان, الأسماك, البرمائيات, الطيور واللبائن اعتمدت على العثور على هذه الأوكياس في براز المصابين ابتداءً من 4-9 أيام بعد الإصابة عن طريق الفم (Arcay et al., 1995), ووجد أيضاً أن أكياس بيض طفيلي *C. parvum* المأخوذة من الأبقار لا تسبب العدوى للأسماك, البرمائيات أو الزواحف لكنها ببساطة تعبر من خلال القناة الهضمية بدون إحداث إصابة معوية Infecting enterocytes (Graczyk et al., 1996b). وحتى ضمن

فئة الفقرات ، فإن أكياس بيض لنوع واحد من طفيلي البويضات الخبيثة عادةً لا تصيب أكثر من مضيف واحد . وقد عُرف عن طفيلي البويضات الخبيثة من نوع *C.wrairi* أنه يصيب فقط خنازير غينيا (Gibson and Wagner,1986) ، وطفيلي *C.bovis* يصيب الماشية (Fayer et al.,2005) .

ووجد أيضاً أن أنواع أخرى من طفيليات البويضات الخبيثة تصيب أغلب أنواع المضائف مع استثناءات نادرة لمضائف إضافية . فعلى سبيل المثال طفيلي *C.felis* يصيب القطط (Iseki,1979 ; Asahi et al.,1991) ، طفيلي *C.canis* يصيب الكلاب (Fayer et al.,2001) بينما طفيلي *C.andersoni* يصيب الماشية وطفيلي *C.muris* يصيب الفئران في حين طفيلي *C.suis* يصيب الخنازير (Ryan et al., 2004) . مع ذلك فإن طفيليات *C.felis* ، *C.andersoni* ، *C.canis* ، وطفيلي البويضات الخبيثة المتعلق بالأيل *Cryptosporidium cervine genotype* كان قد تم اكتشافهم بنسب 0.04 ، 0.1 ، 0.2 ، 0.04 ، 0.04 % بالتعاقب في 2414 من الأشخاص المصابين بالإسهال (Leoni et al., 2006) .

5.2 دورة الحياة Life Cycle:-

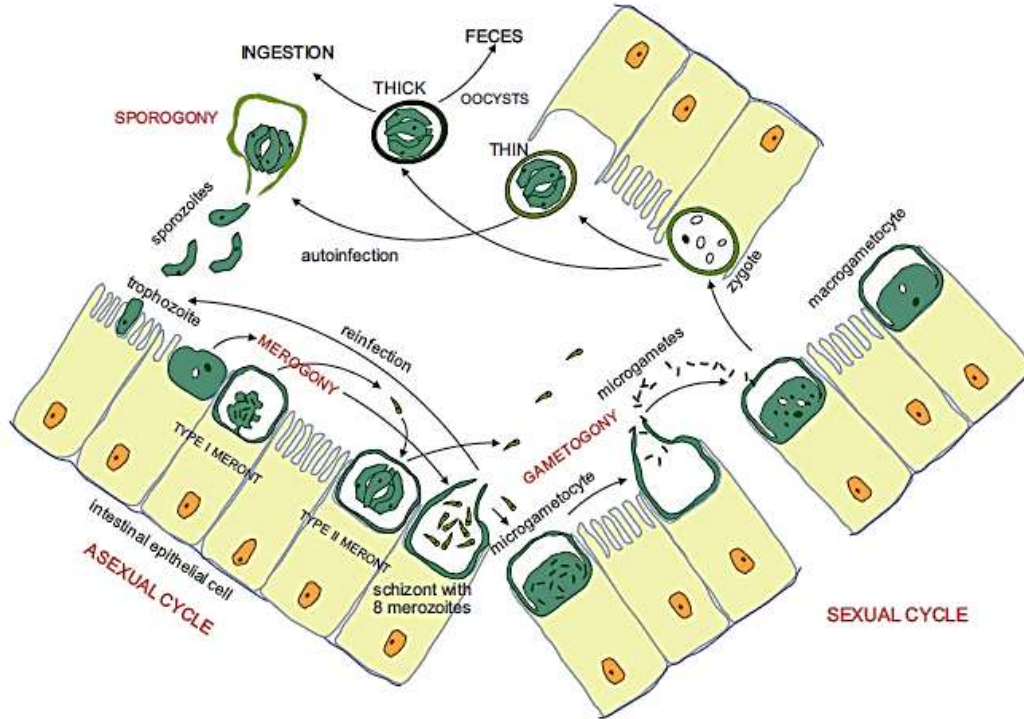
دورة حياة طفيلي البويضات الخبيثة *Cryptosporidium sp* مبينة بالشكل (1-2) ، حيث يكون الموقع الأساس للإصابة بطفيلي *C.hominis* و *C.parvum* هو الأمعاء الدقيقة . في بعض الحيوانات مثل الفئران والعجول يكون اللغائفي Ileum فوق مجمع الأعور The cecal junction هو الموقع المفضل للإصابة بطفيلي *C.parvum* . وُجد طفيلي البويضات الخبيثة في مواقع خارج معوية Extraintestinal sites في الحيوانات (Fleta et al.,1995) . تكتمل دورة حياة الطفيلي ضمن مضيف واحد a monoxenous cycle وتتضمن كلاً من التكاثر الجنسي واللاجنسي (Chen et al., 2002 ; Smith et al., 2005; Fayer, 2008) .

1.5.2 الخروج من الكيس Excystation:-

الطور الداخلي المنشأ Endogenous phase يبدأ بعد ابتلاع المضيف المناسب لأكياس بيض الطفيلي ، فتكون الخطوة الأولى للإصابة في داخل جسم المضيف هي الخروج من الكيس Excystation ، يفتح جدار الكيس عند أحد أقطابه والذي من خلاله تغادر الأبواغ المعدية الأربعة كيس البيض ، إن مرحلة الخروج من الكيس للأبواغ يتطلب أن تتعرض أكياس بيض في المعدة إلى ظروف مختزلة متبوعة بتعرضها إلى الأنزيمات البنكرياسية أو أملاح

الصفراء في الأمعاء الدقيقة أو كلاهما . بالنسبة لطيفلي البويضات الخبيثة فإن التعرض لمثل هذه الظروف يحفز الخروج من الكيس , لكن تحت الظروف المختبرية وُجد أن الأبواغ ممكن أن تخرج من الأكياس في المحاليل المائية الدافئة فقط , ومن الممكن حدوث الإصابة الذاتية للمضيف بسبب هذه الأبواغ حيث سُجِّل حدوث إصابات في مواقع خارج الأمعاء مثل ملتحمة العين Conjunctive of the eye , الجهاز التنفسي (Fayer *et al.*,1990) , المثانة , الغُدة للمفاوية , الخصية , المبيض , الرحم والمهبل (Fleta *et al.*,1995) .

وعلى وجه الخصوص , تكون درجة الحرارة ودرجة الحموضة من أهم المؤثرات على الطيفلي حيث تكون أنواع طيفلي البويضات الخبيثة التي تصيب معدة المضيف مثل طيفلي *Cryptosporidium muris* أسرع استجابة لتلك المؤثرات مقارنة بتلك الطفيليات التي تصيب أمعاء المضيف مما يدل على حاجة الأنواع المعدية لسرعة الخروج من الكيس وتحرير الأبواغ بعد عملية ابتلاع الأكياس (Widmer *et al.*, 2007) . لذلك فإن دور المضيف المُستمد من تلك المؤثرات خلال عملية الخروج من الكيس يختلف باختلاف أنواع طفيليات البويضات الخبيثة .(Smith *et al.*, 2005)



شكل (1-2) دورة حياة طفيلي *Cryptosporidium* (Cacciò and Widmer, 2013)

2.5.2 غزو الخلية والاستيعاب الداخلي Cell Invasion and Internalization :-

تكون الأبواغ المتحررة من كيس بيض الطفيلي متحركة وتقترب أولاً من النهاية القمية المحتملة لخلية المضيف وتغزو الخلية بنشاط (Wetzel et al., 2005). تمتاز هذه الأبواغ بوجود العضيات الإفرازية التي تطرح إفرازاتها خارجياً Exocytose خلال عملية الغزو (O'Hara et al., 2005).

عندما تبدأ الأبواغ بالالتصاق بغشاء خلية المضيف , يبدأ الخيط القوسي Rhoptry بالتمدد إلى موقع الاتصال وتتحرك الخييطات الدقيقة Micronemes والحبيبات الكثيفة إلى منطقة المعقد القمي (Huang et al., 2004). إن أبواغ (وأقسامات Merozoites) طفيلي *C. parvum* تمتلك معقد قمي كلايكوبروتيني يُدعى *Glycoprotein Cryptosporidium* *parvum* sporozoite ligand (CSL) والذي يحفظ ليعمل على المشاركة في الالتصاق بالخلايا الطلائية المعوية خلال عملية الإصابة (Langer and Riggs et al., 1997; Riggs, 1999).

جزئيات CSL تتمركز على السطح المكشوف للمستقبلات الموجود فوق السطح الزغبي للخلايا الظهارية المنشأ (Langer et al., 2001) وهناك نتائج إضافية كان قد تم تسجيلها للبروتينات السكرية (Glycoproteins) مشابهة للمخاطين تقع عند المنطقة القمية (Cevallos et al., 2000), وبروتينات لاصقة مرتبطة بالتخثر تكون ضرورية لغزو خلايا المضيف (Spano et al., 1998b).

تكون الأبواغ الملتصقة في بادئ الأمر نحيلة وذات شكل هلالى أو ملتو , و تصبح بيضوية أو كروية الشكل . ثم تظهر حويصلات من الطفيلي وتتشكل بالقرب من النهاية الأمامية للأبواغ وتتجمع معاً وتحيط الطفيلي وتكوّن فجوة Preparasitophorous (Huang et al., 2004). تندمج المنطقة الفجوية مع غشاء خلية المضيف لتكوّن سطح فاصل بين الطفيلي والمضيف . ويوجد غشاء رقيق يُربط بامتدادات سايتوبلازمية من رُغيبات خلية المضيف يحيط الطفيلي , وفي نهاية المطاف يقوم هذا الغشاء باحتواء الطفيلي ضمن فجوة Parasitophorous ناضجة (Umemiya et al., 2005).

تكون الأبواغ ضمن فجوة Parasitophorous داخل خلوية لكنها ليست على اتصال مباشر مع سايتوبلازم خلية المضيف , أي تكون خارج الساييتوبلازم Extracytoplasmic . وخلال تكوّن فجوة Parasitophorous , تتحرر مواد من الجسم المخروطي عند الطرف الأمامي للأبواغ , في حين تتكون فجوة شفافة ذات غشاء كبير ضمن الثلث الأمامي للأبواغ في المكان الذي يتواجد فيه الخيط القوسي والخييطات الدقيقة . خلال هذا الوقت أيضاً هناك تراكيب تشبه الفجوة عند النهاية القمية للأبواغ تظهر لترتبط مباشرة بساييتوبلازم خلية المضيف . كل من حزمة كثيفة تحت هذا الموقع وفجوة Parasitophorous تحفظ الطفيلي في موقع داخل خلوي

Intracellular لكن يكون خارج الساييتوبلازم Extracytoplasmic . وفي وقت لاحق تتضج الحزمة الكثيفة إلى تركيب فريد من نوعه يُشار إليه كعضية التصاق أو تغذية . ويتقدم عملية غزو الخلية يصبح البوغ كروي الشكل فيُدعى بالأتروففة Trophozoite (وهو الطور النشط) . وفي عملية زراعة الخلية تكتمل عملية الالتصاق والغزو بغضون 15 دقيقة (Lumb et al., 1988) .

3.5.2) التكاثر الجنسي واللاجنسي Sexual and Asexual Reproduction :-

يُدعى التضاعف اللاجنسي بالنماء الجزئي (Merogony) ويتميز بانقسام نواة وساييتوبلازم الأتروففات (Trophozoites) لتوليد المنقسمات meronts حيث يوجد نوعان من المنقسمات في طفيلي *C. parvum* الأول هو Meronts type I ويمتلك 6-8 نويات كل منها ينمو لتكوين أقسومة Merozoite (طور مشابه للأبواغ تركيبياً) وكل أقسومة ناضجة تغادر لتصيب خلية مضيف أخرى لتتطور إلى النوع الأول أو إلى النوع الثاني من المنقسمات بينما النوع الثاني من الأقسام Meronts type II تمتلك 4 نويات تنتج بدورها 4 أقسومات Merozoites. وبعد إصابة خلايا جديدة في المضيف فإن الأقسام من النوع الثاني Meronts type II تبدأ بعملية التكاثر الجنسي من خلال تمايزها إما إلى تراكيب تكاثرية ذكرية Microgamonts أو إلى تراكيب تكاثرية أنثوية Macrogamonts حيث يؤدي الانقسام النووي للتراكيب الذكرية إلى إنتاج العديد من الأمشاج الذكرية للطفيلي Microgametes (الذي يمثل النطفة Sperm cell) والتي تتحرر من فجوة الطفيلي parasitophorous بينما كل تركيب أنثوي (والذي يمثل البيضة Ovum) يُخصب من قبل المشيج الذكرى لتكوين البيضة المخصبة والتي بدورها تتطور إلى كيس البيض oocyst (Cacciò and Widmer, 2013) .

4.5.2) التكاثر البوغي Sporogony :-

يتمايز المشيج المخصب إلى أربعة أبواغ ضمن كيس البيض و تُطرح أكياس بيض الطفيلي الموجودة في القناة المعدية المعوية إلى خارج جسم المضيف مع البراز , إن أكياس البيض ذات الجدران الرقيقة تحرر الأبواغ التي تسبب الإصابة الذاتية للمضيف , بينما الأكياس ذات الجدران الاسمك تغادر جسم المضيف لتصيب مضائف أخرى (Current, 1985, 1988) بينما تُطرح تلك الموجودة في الجهاز التنفسي عن طريق إفرازات الجهاز التنفسي أو الإفرازات الأنفية والبلغم (Mor et al., 2010) .

إن طفيليات البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* وطفيلي *Caryospora* تكون فيها أكياس بيض منتجة للأبواغ متبوعة بحدوث الإصابة الذاتية Autoinfection . تمر الأبواغ بعد تحررها من أكياس البيض بعدة مراحل تطورية schizogony , gametogony و

sporogony داخل الخلايا المعوية لنفس المضيف المصاب , وبذلك فإن دورة حياة طفيلي البويضات الخبيثة تضمن إنتاج أعداد كبيرة من أكياس البيض المعدية (Cacciò and Widmer, 2013) .

5.5.2 المراحل الخارج خلوية Extracellular Stages :-

تم مشاهدة المراحل الشبيهة بالطور الجنسي Gamont في المزارع الخلوية لطفيلي *C. andersoni* وفي وسط حاوي على خلية حرة ملقحة بطفيلي *C. parvum* , حيث تكون الصفات الشكلية لهذه المراحل الخارج خلوية مشابهة لصفات Gregarines , لكن الفحص الجزيئي أثبت أن هذه الصفات تعود لطفيلي *C. andersoni* و قد كانت المشاهدات المقارنة قد أُجريت على هذه المراحل من المحتويات المعوية للفئران المصابة بطفيلي *C. parvum* (Hijjawi et al., 2002,2004) .

6.2 التركيب Structure :-

1.6.2 كيس البيض The Oocyst :

إن جدار كيس بيض طفيلي *C. parvum* هو تركيب ثلاثي الطبقات وبمعدل سُمك يبلغ تقريباً 49nm (Harris and Petry,1999) . يكون سُمك الطبقة الخارجية Outer layer غير منتظم لكن بمعدل 10nm (Reduker et al.,1985) ويوجد تحت هذه الطبقة طبقة شفافة كثيفة Thick electron-lucent layer بسُمك 2.5nm , وتوجد تحت الطبقة الأخيرة طبقة داخلية Inner layer تتألف من منطقتين , المنطقة الخارجية Outer zone بسُمك 11.6nm , والمنطقة الداخلية Inner zone بسُمك 25.8nm . يكون جدار كيس البيض مستمراً ما عدا أحد الأقطاب حيث ينقطع بشق أو خيط مفرد والذي يمتد من ثلث المسافة حتى المنتصف حول محيط كيس البيض. خلال عملية الخروج من كيس البيض Excystation , فإن جدار كيس البيض على جانبي الشق ينكمش ويلتف نحو الداخل فتخرج الأبواغ خارج البيضة . يكون هذا الشق لطفيلي *C. parvum* حساساً لأنزيم التربسين والمادة الصفراء ويشبه في مظهره لذلك الشق الذي وجد في جدار الكيس البوغي لطفيليات *Sarcocystis* , *Toxoplasma* , *Isospora* و *Goussia* مما يدل على وجود علاقة وثيقة بين طفيليات البويضات الخبيثة Cryptosporidium و Sarcocystids أو Calyptosporids (Calyptosporids و *Goussia* و *Calyptospora*) من ناحية النشوء والتطور. ويُعتقد أن يكون الجدار الخارجي Outer wall ذو تركيب بروتيني-سكري Glycoprotein , والطبقة المركزية للجدار يُعتقد بأنها دهنية

سكريّة/بروتينيّة دهنيّة Glycolipid/Lipoprotein والتي تضيف لها بعض الصلابة وهي مسؤولة عن صفة تصبغ الجدار بالصبغة الصامدة للحامض Acid-fast stain . أما الطبقة الداخليّة Inner layer والتي تظهر بشكل خطّي وخيطي Linear and filamentous يُعتقد بأنها بروتينيّة سكريّة Glycoprotein , حيث تعطي بعض الصلابة والمرونة للجدار . تختلف أكياس بيض رقيقة الجدران في كون جدارها لا يحتوي على طبقة داخلية سميكة متعددة المناطق Thick multizoned inner layer (Fayer, 2008).

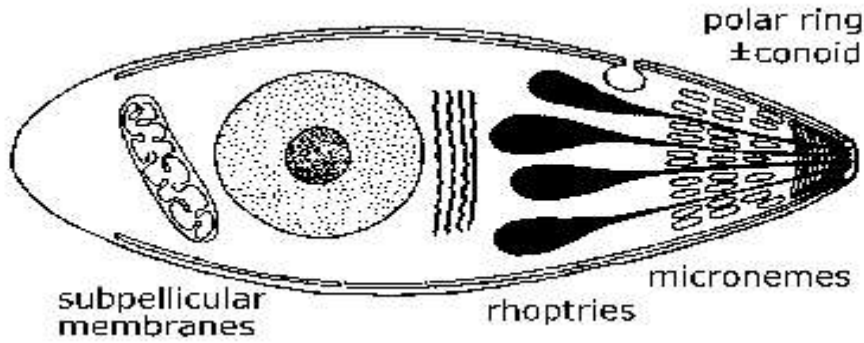
يحتوي كيس البيض داخله على جسم جزئيّ مغلق الغشاء وعلى 4 أبواغ , ويحتوي الجسم الجزئيّ على جسم دهنيّ كبير , عدد من حبيبات Amylopectin , ويتضمن بروتين بلوري Crystalline protein , رايبوسومات وأغشية خلويّة Cytomembranes . تشمل حبيبات Amylopectin على سلاسل متفرعة معقّدة من السكريات المتعدّدة complex branched polysaccharide chains لنوعين شكليين من حبيبات كبيرة مسطحة ملساء ملتقّة داخلياً بشكل يشبه كرة الخيط , وحبيبات صغيرة غير منتظمة السطح وجسيمات داخلية تُشبه القضيب Rod like particulate interior (Harris et al., 2004).

2.6.2 الأبوغ Sporozoites :-

تكون أبواغ طفيليّ *C.prvum* مُشابهة لتلك الموجودة في الأكريات Coccidia . وأظهر المجهر الإلكتروني النافذ (TEM) Transmission electron microscopy وجود عُضَيّات نموذجيّة للشعبة . ويوجد تحت الجليد Pellicle نُبيبات تحت الجليد Subpellicular microtubules تنشأ عند الطوق القميّ الكثيف Electron-dense apical collar مع حلقات قميّة تمتد نحو الخلف . يتألّف المعقد القميّ The apical complex من حلقات قميّة , والمخروط وعُضَيّات خاصّة لغزو خلية المضيف وهي : خيط قوسي مفرد Rhoptry , خويطات Micronemes و حبيبات كثيفة Electron-dense granules . تكون الخيوط القوسية لمعقدات القمة Apicomplexans دورية الشكل , مربوطة الغشاء , عُضَيّات إفرازية كثيفة Electron-dense secretory organelles يُعتقد أنها تنشأ من الشبكة الإندوبلازمية بواسطة إفراز كولجي Golgi secretion (Sam-Yellowe,1996) . أما الخويطات Micronemes في الأبوغ المتكيسة الحديثة تكون ملتصقة على شكل صفوف من الأجسام قضيبية الشكل . يبلغ كل Microneme تقريباً $35 \times 100 \text{nm}$, لديه نمط مُطرز داخلي شبه حلزوني يُعتقد أنه Protein polymer (Harris et al., 2003).

تكون كل من عُضَيّة كولجي , النواة , حبيبات الأمايلوبكتين الصغيرة والرايبوسومات ذات موقع أكثر مركزيّة , ويقع خلف النواة جسم بلوري مُبهم لا يُعرف عنه لا المنشأ ولا الوظيفة . بين

الجسم البلوري والنواة توجد عُضِيَّة ثنائية الغشاء ومحاطة بعدة قطع من الشبكة الإندوبلازمية الخشنة على صلة بالميتوكوندريا يشار لها باسم بقية المايوتوكوندريا Relict mitochondrion (Keithly et al., 2005). هذه المايوتوكوندريا غير الاعتيادية تحتوي على حجرات داخلية لكنها تفتقد للأعراف الأنبوبية النموذجية The typical tubular cristae التي شوهدت في الأكريات الأخرى Coccidia , وتشبه النواة المختزلة لبعض خلايا طحلب Cryptomonad المتعايشة والتي عثر عليها ضمن المضائف أحادية الخلية (Putignani, 2005) شكل (2-2)



شكل (2-2) تركيب أبواغ طفيلي البويضات الخبيثة

<http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/api.html>

7.2 وسائل انتقال الطفيلي Means of Transmission :-

تنتقل أكياس بيض الطفيلي وتحدث الإصابة بعدة طرق منها (أنظر الشكل 2-3):

1.7.2 مياه الشرب Drinking water :-

إن المياه الملوثة تُعد عاملاً خطراً جداً للإصابة بداء البويضات الخبيثة Cryptosporidiosis (Castro-Hermida et al., 2009 ; WHO, 2009). وحتى مياه الشرب المُعالجة بشكل جيد ممكن أن تسبب المرض في حال إحتوائها على عدد كافٍ من أكياس البيض الحيوية المعدية لطفيليات البويضات الخبيثة *Cryptosporidium* sp . ومن الممكن لأكياس البيض أن تبقى حيوية لأكثر من سنة عند درجة حرارة 4°م في مياه البحر الاصطناعية (Tamburrini and Pozio, 1999) .

لم يُوثَّق بشكل جيد كيفية إحتفاظ طفيلي البويضات الخبيثة بحيويته Viability و معرفة مصدر وجود الأكياس في مياه الحنفية بسبب عدم فحص هذه المياه بشكل دوري وعدم وضوح أهمية العثور على الأكياس في المياه على الصحة العامة . ومع أن الإصابات التي تحدث في الأفراد عن طريق المياه يصعب تسجيلها , فإن تفشي داء البويضات الخبيثة Cryptosporidiosis المرتبط بمياه الشرب يؤكد بشكل واضح بأن الأكياس النشطة لطفيلي

C.parvum تدخل وتعتبر من خلال مراحل عملية تنقية مياه الشرب (Fayer et al., 2000).

إن أول إصابة سُجِلت بداء البويغات الخبيثة في الإنسان نتيجة تلوث إمدادات المياه حدثت في ولاية تكساس سنة 1984 مع تفشي فايروس Norwalk ومصدر المياه كان بئراً أرتوازيماً يُشتبه بكونه كان ملوثاً بمياه المجاري . وكان التطهير بالكلور هو المعالجة الوحيدة ومع أنه كان كافياً للسيطرة على البكتريا البرازية Coliform bacteria إلا أنه لم يكن كافياً للسيطرة على فايروس Norwalk وطفيليات البويغات الخبيثة (WHO, 2009) .

كانت المعلومات الأولى المتوفرة للعلماء عن تفشي المرض بواسطة المياه هي:-

- إن طفيلي البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* ممكن أن ينتقل عن طريق نُظْم البلدية لمياه الشرب ويُسبب تفشي واسع للإصابة به.
- إن أنظمة التعقيم بالكلور (طفيلي *C.parvum* يكون حساساً لـ 1.75-2ppm) كانت ضعيفة خاصة بدون ترشيح .
- تفشي المرض ممكن أن يحدث خلال مياه الشرب التي تجتمع فيها بكتريا Coliform مع معايير التعكر Turbidity standards.

وهناك كثيراً من الأمراض المتفشية والتي تنتقل عن طريق الماء تم توثيقها وكانت مماثلة لتلك المذكورة أعلاه (WHO, 2009).

إن عدم كفاية كميات مادة Polyaluminium chloride أو Alumcoagulant فشلت في تقليل ارتفاع نسبة التكدر , وأن إعادة تدوير فلتر مياه الغسل العكسي Backwash water زادت من عدد أكياس بيض الطفيلي في المياه النهائية (Fayer et al., 2000 ; Keegan et al., 2008) .

عُدَّت الأمطار الغزيرة , السماد الحيواني في الحقول , نفايات المجازر , مقلب النفايات وتدفق مياه الصرف الصحي من المصادر المحتملة لنقل أكياس بيض الطفيلي وانتشار الإصابة بداء البويغات الخبيثة (Kuczynska , 2005 ; McEvoy , et al. ,2005; Graczyk et al.,2008 ; Keeley and Faulkner, 2008) .

إن انتشار داء البويغات الخبيثة عن طريق مياه الشرب المُعالجة بالوسائل التقليدية كان بمستوى أعلى من مستوى الخطر الذي اقترحتته منظمة الصحة العالمية World health Organization (WHO) , وأدنى من مستوى الخطر الذي اقترحتته وكالة حماية البيئة الأمريكية (Xiao et al.,) the United States Environmental Protection Agency (2012) .

2.7.2 مياه أحواض السباحة العامة Recreational water:

سُجِّل في السنوات الأخيرة تفشي داء البويغات الخبيثة Cryptosporidiosis مرتبطاً بمياه أحواض السباحة (Yokoi *et al.*, 2005). اقترن التلوث البرازي المتكرر بمقاومة أكياس بيض الطفيلي لمادة الكلور (Xiao and Cama, 2006). إن انخفاض جرعة العدوى وارتفاع كثافة السابحين في مياه المسابح سهّلت من انتقال أكياس بيض الطفيلي وحدوث الإصابة (Sunderland *et al.*, 2007; Beach, 2008).

وحتى في الظروف المثلى لتصميم حمام السباحة وجودة المياه والتنقية والتطهير لا يمكنها منع التلوث بالبراز، ومع ذلك فإن الاستخدام الدوري لمياه أحواض السباحة بواسطة الأفراد المصابين بسلس البول وحتى الأطفال الصغار والرضع، يزيد من إمكانية انتقال العدوى عن طريق المياه (Fayer *et al.*, 2000).

ولا يزال داء البويغات الخبيثة من أكثر أمراض الجهاز الهضمي تفشياً في المملكة المتحدة وفي الولايات المتحدة الأمريكية والأكثر انتقالاً عن طريق مياه أحواض السباحة (Hlavsa *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2006; Yoder and Beach 2007; Yoder *et al.*, 2010).

3.7.2 (3.7.2) الطعام Food:

أشارت الدراسات في مختلف أنحاء العالم إلى تلوث أنواع عديدة من الطعام بأكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة، وقد ركزت هذه الدراسات على الفواكه والخضراوات وذلك بسبب أن هذه الأطعمة تكون أكثر عرضةً للتلوث لأنها غالباً ما تُستهلك نيئة أو تكون معالجة بالحد الأدنى من الحرارة وبالتالي تزداد نسبة انتقال المرض، وقد زاد إجراء الأبحاث التي ركزت على دور متداول الأطعمة كمصدر لتلوث الطعام وسبباً لانتقال داء البويغات الخبيثة لاحقاً (Robertson and Chalmers, 2013).

ومؤخراً، تم التحقق من دور متداولي الأطعمة في فنزويلا حيث ينتشر داء البويغات الخبيثة كأحد المشاكل المهمة التي تؤثر على الصحة العامة (Freites *et al.*, 2009). في بولندا تم فحص 163 عينة من الأسواق المحلية شملت: ملفوف بكين، الكراث، الملفوف الأبيض، الملفوف الأحمر، الخس، البصل، الكرفس، القرنبيط، البروكلي، السبانخ، براعم بروكسل، التوت والفراولة، حيث تم اكتشاف أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة في عينة كراث واحدة، وعينة كرفس واحدة وفي 4 عينات من الملفوف، بما في ذلك جميع أنواع الملفوف التي تم فحصها، وتجدر الإشارة إلى أن العينات المصابة بطفيلي البويغات الخبيثة جاءت من المناطق التي فيها أكبر عدد من قطعان المواشي (Rzezutka *et al.*, 2010).

وفي إسبانيا، تم فحص 19 عينة من الأسواق المحلية ، حيث تم إيجاد أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة في 33% من الملفوف الصيني و 75% في خس Lollo rosso و 78% في الخس الروماني (Amoro's et al., 2010) .

من الممكن أن تتلوث الخضراوات من سماد براز الحيوانات أو الإنسان بواسطة تلوث المياه المستخدمة للري أو المستخدمة لترطيب المنتج بواسطة الأيدي المتسخة لعمال الزراعة ومن أيدي عمال إنتاج الأغذية والطعام ومن الأسطح الملوثة في أماكن خزن وحفظ الخضراوات أو أماكن تحضير وبيع الخضراوات (; Yoshida et al., 2007 ; Siwila et al., 2007 ; Topp et al., 2009 ; Abougrain et al., 2010) .

إن اكتشاف أكياس بيض الطفيلي في الخضراوات عملية صعبة لذلك فإن استخدام طرق جزيئية لاكتشافها وتحديد أعداد قليلة من هذه الأكياس يكتسب أهمية أكبر مع زيادة التجارة العالمية بالمنتجات الطازجة (Laberge et al.,1996 ; Fayer et al., 2000) .

4.7.2 من شخص لشخص Person-to-person:

يحدث انتقال المرض من شخص إلى شخص آخر عن طريق البراز والفم في الأسرة الواحدة (Newman et al.,1994) . من المرجح أيضاً أن تكون مراكز الرعاية الشعبية وتلك التي ترتبط بالمستشفيات مرتبطة بصورة مباشرة بانتشار المرض من شخص لآخر في أطر مؤسسية إذ من الصعب السيطرة على النظام الصحي (Mahdi and Ali, 2002) .

أظهرت البيانات ارتفاع حالات الإصابة بداء البويغات الخبيثة Cryptosporidiosis بين الرجال مثليي الجنس Homosexual men ، على الرغم من احتمالية انتقال المرض المرتبط بتصرفات أخرى غير مستبعد (Fayer et al., 2000 ; Hellard et al., 2003) . وينتقل هذا المرض بسهولة أكبر بين الأطفال وخصوصاً في المدارس (Lee and Greig, 2010) .

5.7.2 من الحيوان إلى الإنسان Animal-to-human:

بالإضافة إلى روابط الإصابة بداء البويغات الخبيثة البقري Bovine cryptosporidiosis (النمط الوراثي الثاني Genotype II) للمواشي المعروضة على المزارع والإصابة من خلال تناول الحليب غير المبستر وعصير التفاح (Dillingham et al., 2002) ، فإن حالات إصابة الإنسان بهذا المرض تتضمن أيضاً انتقال الطفيلي من الحيوانات مثل القطط ، الكلاب والديك الرومي (; Xiao et al, 2007 ; Pedraza-Diaz, et al., 2001; Kváč, 2009) .

وقد دعمت الدراسات الجزيئية حقيقة انتقال الإصابة من الحيوانات إلى الإنسان حيث تم تسجيل تفشي داء البويغات الخبيثة بين 5 أشخاص في المملكة المتحدة كانوا على اتصال مباشر بالحملان (Chalmers and Giles, 2010). وأيضاً في إيطاليا تم تسجيل حدوث الإصابة بين الأطفال بطفيلي *C.parvum* عن طريق الحملان المصابة بهذا الطفيلي (Caccio', et al., 2013). وعلى العكس من ذلك لا يعرف إلا القليل عن دور الماعز في نقل داء البويغات الخبيثة , إذ أن من الممكن إصابة الماعز بطفيلي من نوع *C. xiaoi* والذي يُعد من الأنواع غير حيوانية المنشأ بالإضافة إلى إصابتها بطفيلي من نوع *C.parvum* (Rieux, et al., 2013).

6.7.2 المصادر البيئية المحتملة الأخرى Other potential environmental sources

- **التربة Soil**: إن تلوث التربة والمياه السطحية بفضلات الصرف الصحي ممكن أن تؤدي في نهاية المطاف إلى تلوث الأطعمة الطازجة , مياه الشرب ومياه أحواض السباحة (Walker and Redelman, 2004). تم تطبيق أكياس بيض الطفيلي والموجودة في براز المواشي على كتل من التربة والتي تم ريثها بشكل منقطع , فتمت مشاهدة هذه الأكياس ضمن التربة لعدة أسابيع وفي بعض الحالات لأكثر من 70 يوماً (Fayer, et al., 2000). لكن نسبة الأكياس في التربة اعتمدت على نوعية التربة حيث كانت النسبة في التربة الطينية أكثر منها في التربة المزيجية , بينما لم يتم العثور على هذه الأكياس في التربة الرملية (AL-Gelany, 2003).
- **الطيور Birds**: افترض الباحثون أن أكياس بيض طفيليات البويغات الخبيثة *Cryptosporidium sp* ممكن أن تنتشر على مساحات واسعة بواسطة الطيور (Georgopoulou and Tsiouris, 2008 ; Plutzer and Tomor,2009). في وقت لاحق تبين أن الإوز الكندي (*Branta Canadensis*) ممكن أن تلعب دور ناقلات عرضية Accidental carriers للعدوى بهذا الطفيلي للإنسان وأحياناً تلعب دوراً ثانوياً في دورة انتقال الطفيلي من الحيوان للإنسان . وقد تم تحديد نوعين شائعين من هذه الطفيليات في الطيور *C.hominis* و *C.parvum* (; Zhou et al., 2004) (Ryan, 2010), حيث تعبر هذه الطفيليات القناة المعوية المعوية لطيور بط بكين (Peking ducks(*Anas platyrhynchos*) ثم تطرح مع البراز بفترة تقارب الأسبوع , وأيضاً كانت لهذه الطفيليات القدرة على إصابة الفئران (Graczyk et al.,1996a). هناك دراسة أخرى تعزز مفهوم أن جنس البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* يمتلك تنوعاً كبيراً لمضائفه من الطيور وخصوصية منخفضة لأنواع الطيور (Nakamura et

(al., 2009) . وقد أشارت الدراسات الحديثة إلى أن ما مجموعه 10 أنماط وراثية جديدة من طفيلي البويضات الخبيثة وُجدت في الطيور (Ryan, 2010) .

- **الرخويات Mollusca**: أظهرت عدة دراسات أن مختلف رخويات المياه العذبة والرخويات البحرية تستطيع أن تتلغ وتحمّل أكياس بيض طفيليات البويضات الخبيثة (Miller et al, 2005; Downey and Graczyk, 2007 ; Lucy et al., 2008)

7.7.2) الذباب والصراصير وغيرها من الناقلات المحتملة Flies, cockroaches and :potential vectors other

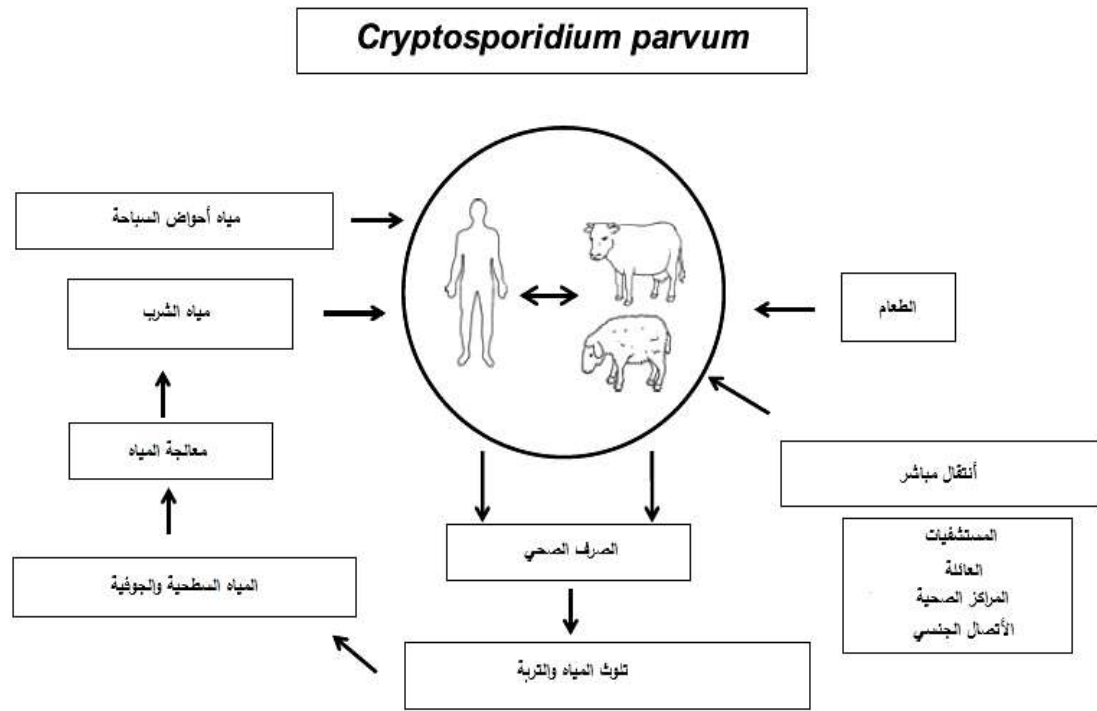
- **الذباب Flies**: تنقل أكياس بيض الطفيلي *C.parvum* بواسطة ذباب القاذورات Filth flies وليس فقط من المواشي ولكن ممكن نقلها من أي مصدر غير صحي ملوث بأكياس هذه الطفيليات مثل: المراحيض , المسالخ , القمامة , مواقع طمر النفايات , الجثث النافقة , ومياه الصرف الصحي (Graczyk et al., 2000 ; Szostakowska et al., 2004) . وكذلك تم تسجيل أن Synanthropic flies على أنه من أهم العوامل البيئية الناقلة للطفيلي والمسؤولة عن انتشار إتهاب المعدة والأمعاء الحاد acute gastroenteritis مثل داء البويضات الخبيثة Cryptosporidiosis (Nmrosi et al., 2006) .

- **الصراصير Cockroaches**: وُجدت أكياس بيض طفيلي *C.parvum* في القناة المعوية لصراصير (*Periplaneta americana*) , مما يشير إلى أن الصراصير كان لها دور في نشر الطفيلي (AL-Gelany,1998 ; Tاتفeng et al., 2005) .

- **الخنافس Beetles**: تم انتشار أكياس بيض طفيلي البويضات الخبيثة من الأسطح الخارجية لمختلف أنواع الخنافس , مما يشير أيضاً إلى أنها قد تكون قادرة على نشر هذه الأكياس في البيئة (AL-Gelany, 2003) .

- **عن طريق الهواء Airborne**: ليس واضحاً كيفية إصابة الجهاز التنفسي بطفيلي البويضات الخبيثة *C.parvum* إلا أنه يعد الخطوة الأولية لإصابة الجهاز الهضمي . قام الباحثون بعمل إصابة للقناة المعوية للمعوية للخنازير الصغيرة عن طريق الرذاذ الحاوي على أكياس بيض الطفيليات وعن طريق انتقال العدوى من الحيوانات المصابة إلى الحيوانات غير المصابة والموجودة في نفس المرفق دون اتصال مباشر بخلاف الهواء . هذه الملاحظات الأولية توجي بقوة إلى أن الإصابة بطفيلي *C.parvum* ممكن

أن تكتسب بواسطة استنشاق أكياس البيض المحمولة جواً (Tzipori and Ward, 2002). وعلى الرغم من تكرار الأعراض التنفسية في الأشخاص منقوصي المناعة والمصابين بداء البويغات الخبيثة Cryptosporidiosis واكتساب الجهاز التنفسي للطيور لأنفلونزا الطيور إلا أن انتقال أكياس بيض الطفيلي المحمولة جواً إلى الإنسان لم توثق بشكل جيد (Dillingham et al., 2002) .



شكل (2-3) الطرق الرئيسية لانتقال طفيلي *C. parvum* (Cacciò and Widmer, 2013) .

8.2 وبائية داء البويغات الخبيثة Epidemiology of Cryptosporidiosis:

تم تسجيل أول إصابة بداء البويغات الخبيثة العُرضي في تركيا في عام 1955 , كما وسجلت حالات الإصابة بطفيلي البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* في سبعينيات القرن الماضي والتي سببت الإسهال في العجول حديثة الولادة , ومن أولى هذه الحالات كانت في فتاة صغيرة مصابة بالتهاب الأمعاء Enterocolitis (Holscher and Yardley, 1976). والحالة الأخرى في شخص مُصاب بمرض نقص المناعة المكتسب AIDS (Meisel et al., 1976) .

كما تم تسجيل الإصابة بداء البويغات الخبيثة لأول مرة في إنكلترا و ويلز في سبعينيات القرن الماضي وبدأ فحص عينات البراز في عام 1983 . تميّزت السنوات ما بين عامي 1983-1988 بزيادة حالات الإصابة نتيجة لزيادة الكشف المختبري وفحص وإعداد التقارير . كانت ذروة الإصابة بداء البويغات الخبيثة Cryptosporidiosis في عام 1989 ترجع في

معظمها إلى تفشي المرض بشكل كبير عن طريق الماء في Oxford/Swindon . ومنذ ذلك الحين ظلت حالات الإصابة بطفيلي البويضات الخبيثة تتراوح بين 3000-6000 حالة سنوياً (بمعدل 4559) حالة (Nichols et al., 2006).

من الممكن أن تتضمن أعراض الإصابة بداء البويضات الخبيثة Cryptosporidiosis في المصابين ذوي المناعة السوية Immunocompetent patients ما يلي:

- إسهال مائي .
- مغص بطني .
- حمى خفيفة .
- غثيان وتقيؤ .
- الآم الرأس .
- الإجهاد .
- فقدان الشهية .
- مشاكل في الجهاز التنفسي .

ويعد الإسهال أكثر الأعراض شيوعاً , وينتج عنه طرح أعداد كبيرة جداً من أكياس البيض المعدية Infectious oocysts . تتراوح فترة حضانة الطفيلي بحدود 7 أيام وعادةً ما تستمر الأعراض لأسبوع أو أسبوعين مع تواجد أكياس البيض في البراز المطروح من الشخص المُصاب لمدة تصل إلى 18 يوم بعد ظهور الأعراض (أحياناً تصل لفترة طويلة تقريباً 50 يوماً). وقد تم تسجيل إصابات عديمة الأعراض Asymptomatic infections مع طرح الأكياس المعدية في الأشخاص الأصحاء (Peng et al., 1997) .

تم تشخيص حالات الإصابة بداء البويضات الخبيثة بشكل أكبر مع انتشار مرض نقص المناعة المكتسب AIDS في ثمانينات وتسعينات القرن الماضي , كما ويحدث داء البويضات الخبيثة Cryptosporidiosis في جميع أنحاء العالم , وكانت الدراسات المصلية الوبائية Sero-epidemiological studies قد أشارت إلى أن 20% من الأمريكيين كانوا قد عانوا من الإصابة بطفيلي البويضات الخبيثة *Cryptosporidium* المسبب لداء البويضات الخبيثة Cryptosporidiosis , بينما كشفت أرقام إصابة الأطفال في الصين بهذا المرض إلى أن نسبة حدوث المرض تصل إلى 65% , فضلاً عن الأعراض الحادة فإن هناك عواقباً محتملة على المدى البعيد من الإصابة بطفيلي البويضات الخبيثة , فالإصابة في سن مبكرة يمكن أن تؤدي إلى إضعاف واختلال في النمو واحتمال حدوث عجز إدراكي Cognitive deficits على المدى الطويل , خاصةً بين الأطفال في البلدان النامية (Dillingham et al., 2002) .

تكون النتائج المترتبة عن الإصابة بطفيلي البويضات الخبيثة في الأشخاص ذوي الجهاز المناعي المُثبَّط Suppressed immune system (الناتج بسبب مرض نقص المناعة المكتسب AIDS أو تناول العلاج المُثبَّط بعد جراحة زراعة عضو) شديدة وأحياناً قاتلة . تحدث أعراض داء البويضات الخبيثة لفترات طويلة من الزمن , ويمكن للعدوى أن تنتشر خارج الأمعاء إلى مواقع أخرى مثل المرارة أو القناة الصفراوية . ويمكن للمُصابين بهذا المرض أن يُشفوا بشكل كامل خاصةً بعد إستعادة نظامهم المناعي (مثل إيقاف العلاج المُثبَّط للمناعة أو بمعالجة سوء التغذية) , لكن بعض المُصابين لا يتمكنوا من ذلك (Nichols *et al.*, 2006 ; Al-Dulaimi and Mughier, 2013) .

9.2 التشخيص Diagnosis :-

شُخص داء البويضات الخبيثة لأول مرة في الإنسان في أواخر عام 1970، إذ تطلب التشخيص آنذاك أخذ خزعات نسجية للأمعاء. ومنذ عام 1981 تم التعرف على العديد من التقنيات السهلة التي يمكن الاعتماد عليها في تشخيص أكياس بيض طفيلي البويضات الخبيثة في البراز ومن ثم تطورت هذه التقنيات (Maggi *et al.*, 2000 ; Morrison, 1998).

إن الطرق التقليدية المتبعة للكشف عن أكياس بيض طفيلي البويضات الخبيثة في البراز غير كافية للتشخيص، إذ أن حجم الطفيلي مقارب لحجم الخمائر التي تقدر بـ 4 - 6 مايكرومتر مما يؤدي إلى صعوبة التمييز بين الخميرة والطفيلي، لذلك يوصى باستخدام العديد من التقنيات المستخدمة لتشخيص أكياس البيض وهي (Peterson, 1998 ; Macpherson and Mcqueen, 1993 ; Potters and Van Esbroeck, 2010) :

1- الصبغ بالزئيل نلسن المحورة باستخدام صبغة الكاربول فوكسين

. Modified Ziehl-Neelsen/carbolfuchsin stain

2- التصبغ بصبغة كيمزا Giemsa staining

3- التصبغ بصبغة رودامين واورامين Rhodamin and ouramine staining

4- التطويق بالمحلول السكري المشبع Sheather's sucrose flotation

5- اختبار التآلق المناعي المباشر وغير المباشر

. Direct and indirect immunofluorescent test

6- استخدام Kit في التشخيص

. (Merifluor cryptosporidium kit, Meridian diagnostics)

7- التطويق بالمحلول السكري المحورة في عينات البراز المرسبة باستخدام

. Sodium acetate-acetic acid-formalin

وتعد طريقة الصبغ بالزئيل نلسن المحورة باستخدام صبغة الكاربول فوكسين من أكثر الطرق التقليدية المستخدمة في تشخيص العدوى طفيلي البويغات الخبيثة في الإنسان والحيوان ، حيث ما زالت تعد المعيار الأساسي للكشف عن أكياس بيض الطفيلي (Potters and Van Esbroeck, 2010) . ومع ذلك فإن نسبة تخصص وحساسية تقنية تصبغ عيّنات براز الإنسان بصبغة الزئيل نلسن سجلت 98.9% و 83.8% على التوالي (Fayer et al., 2000 ; Morgan et al., 1998a ; Paul et al., 2009) ، ونسبة 67.7% و 79.3% على التوالي في عيّنات المواشي والخنازير (Quilez et al., 1996) .

إن تقنية التصبغ بصبغة الزئيل نلسن فعّالة من حيث التكلفة والوقت الذي تستغرقه حيث تحتزل وقت العمل وتستغرق وقتاً يتراوح بين (30-45 دقيقة) ولكنها تتطلب تدريباً مكثفاً وخبرة كبيرة لتفسير النتائج (Potters and Van Esbroeck, 2010) .

إن تركيز عيّنات البراز باستخدام طريقة التطويق بالمحلول السكري المشبع أو باستخدام طريقة الترسيب في محلول formalin-ethyl acetate قد تم وصفها كخطوات مهمة قبل عملية التصبغ ، حيث تسمح بالكشف عن أكياس بيض الطفيلي حتى وإن كانت بأعداد أقل بسبع مرات في عيّنات البراز غير المركزة (Paul et al, 2009) .

وقد أشار Collee et al.(1996) إلى الطرق التشخيصية المتبعة في الكشف عن أكياس بيض الطفيلي البويغات الخبيثة المتمثلة بطريقة التطويق بالمحلول السكري المشبع وصبغ مسحة البراز بالكاربول فوكسين أو السفرائين O، إذ تظهر أكياس البيض المصبوغة بالزئيل نلسن المحورة بشكل بيضوي براق وقد تحتوي على نقاط داكنة الصبغة (Youssef et al., 1998) . أما أكياس البيض المصبوغة بصبغة السفرائين فتظهر بلون برتقالي براق محاطة بهالة، في حين يكون كيس البيض بشكل كروي أو بيضوي داكن اللون عند استخدام صبغة كيمزا (Shehabi and Karmi, 1992) . وفي دراسة أجراها Webster et al. (1996) للمقارنة بين عدة طرق تشخيصية للكشف عن أكياس بيض طفيلي *C. parvum* وهي الإليزا The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ، التآلق المناعي Immunofluorescence assay (IFA) ، اورامين-فينول (AP) Auramine-Phenol ، هينز Heine's ، كروس ومورهيد Cross and Moorhead ، سفرائين مثيلين الأزرق Safranin- Methylene blue ، زئيل نلسن السريعة Rapid Ziehl-Neelsen ، زئيل نلسن المحورة (modified Ziehl Neelsen mZN) وكوستر Koster ، وجدوا ان (AP) و (mZN) كانت أفضل الطرق المستخدمة للكشف عن الأكياس بحدود 20000 كيس بيض/غرام من البراز وإن هاتين الطريقتين ملائمتان للكشف عن أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة في عيّنات المضائف التي تظهر الأعراض السريرية.

يعد فحص التآلق المناعي (IFA) أكثر حساسية من طريقة التصبغ بصبغة الزيل نلسن في الكشف عن أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة خاصة في عيّنات براز الإنسان والحيوان والتي تحتوي القليل من الطفيليات وكميات كبيرة من الفضلات (Casemore, 1991 ; Quilez *et al.*, 1996 ; Garcia and Shimizu, 1997 ; Chalmers *et al.*, 2011). ومن الطرق المتبعة في الكشف، فضلاً عن صبغ عينات البراز بصبغة الزيل نلسن، استخدام الفحص بالمجهر الإلكتروني (Electron microscopy (Baxby, 1984) ، واستخدام مستضدات الطفيل للكشف عنه باستخدام الصبغة المناعية Immunostaining المعلمة بالمادة المتألقة (FITC) Fluorescein iso-thiocyanate labeled monoclonal antibody وفحص الإليزا بالاعتماد على الأجسام المضادة الخاصة بطفيل البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* specific antibody (Fanjry, L., Fujikawa *et al.*, 2002 ; 2000).

إن التقنيات الجزيئية مثل تفاعل البلمرة PCR يمكنها أن تضمن تشخيصاً دقيقاً للأنواع والأنماط الوراثية للطفيلي (Xiao *et al.*, 1999b ; Coupe *et al.*, 2005) وأيضاً على مستوى الأنواع الفرعية (Xiao, 2010). وقد تم تمييز عدد قليل من الجينات لمختلف أنواع طفيلي البويغات الخبيثة مثل: small subunit rRNA أو جين 18s rRNA , 70KDa heat shock protein (HSP70) وبروتين جدار أكياس بيض الطفيلي the oocyst wall protein (COWP). وإن استخدام جين ssu rRNA له فوائد أكثر من الجينات الأخرى بسبب أعداد النسخ الكبير ووجود مناطق محفوظة تتخللها مناطق متعددة الأشكال polymorphic regions والتي تسهل عملية تصميم بواقي تفاعل البلمرة Poly chain reaction (PCR) (Xiao *et al.*, 2004a).

تم وصف تقنيات تفاعل البلمرة PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) لتمييز أنواع طفيلي البويغات الخبيثة وجميعها اعتمدت على جين ssu rRNA (Xiao and Ryan, 2004b). وقد تم تطوير أدوات تشخيص الأنماط الوراثية الفرعية لطفيلي *C.parvum* وطفيلي *C.hominis* مثل: double strands (ds) RNA , microsatellite tools وجين (GP60) glycoprotein 60KDa (Xiao *et al.*, 2001a).

يملك جين GP60 تنوع عالي في أعداد تكرارات القواعد النروجينية الثلاثية Trinucleotide مع اختلاف امتداد التسلسل extensive sequence difference في المناطق غير المكررة والتي تُصنّف طفيلي *C.parvum* و طفيلي *C.hominis* إلى عدة عوائل

فرعية هي : IIL و Ila-IIIi , IIIk و IIL لطيفلي *C.parvum* و Ia , Ib , Id , Ie , If و Ig لطيفلي *C.hominis* (Xiao, 2010) .

وجد بعض الباحثين أن الفحوصات المعتمدة على PCR لها حساسية عالية في الكشف قد تصل إلى الكشف عن وجود كيس بيض واحد فقط في العينة لذلك تم عدّ هذه التقنية أكثر حساسية من التحليل المجهرى المعتمد على عمل مسحات التصبيغ (Morgan-Ryan et al., 2002).

هناك عدة عوامل من الممكن أن تصعب عملية الكشف عن طيفلي *C.parvum* في عينة البراز باستخدام تقنية PCR منها (Tzipori, 1998) :

- حفظ العينات بمحلول الفورمالين بتركيز 10% يؤدي إلى التقليل من حساسية فحص PCR , خاصة إذا استمر حفظ العينات لفترات طويلة .

- حفظ العينات لفترات طويلة بمحلول الفورمالين قد يؤدي إلى حدوث تغييرات في قابلية أكياس بيض الطيفلي *C.parvum* على الطفو مما يؤدي إلى التداخل مع الطرق القياسية لتتقية أكياس بيض الطيفلي من عينة البراز .

كما بإمكان تقنية PCR الكشف عن أكياس بيض الطيفلي في عينات البراز المجمدة لكن تكون حساسيتها أقل في هذه الحالة بسبب احتمالية تفجر الأكياس خلال عملية التجميد والذوبان . ومن الممكن لعدة مواد أن تعمل على تثبيط فحص PCR منها : بعض مكونات عينة البراز , وقد قام بعض الباحثين بتطوير طرق استخلاص الأحماض النووية من عينات البراز للتخلص من هذه المثبطات (Weir et al., 2002) .

تستخدم المواد التجارية العامة General Commercial kit المصنّعة من قبل الشركات العالمية لاستخلاص الحمض النووي من عينات البراز لغرض استخدامها في التطبيقات الجزيئية ومن ضمنها تقنية PCR , حيث تكون هذه المواد محضرة بمختبرات معقمة وبتراكيز دقيقة وتراقبها ارشادات للمستخدم عن كيفية استخدام هذه المواد وتراكيزها اختصاراً للوقت وتجنباً لأي خطأ قد يحدث بإعداد هذه المواد حسب الطرق الكلاسيكية التي كانت تُستخدم سابقاً وبالتالي يتم تطبيق التقنيات الجزيئية على أكمل وجه , ومن فوائد ومحاسن استخدام هكذا مواد هو <http://us.bioneer.com> :

- الحصول على DNA من العينات بصورة سريعة وأكثر سلاسة.
- يتم التخلص بشكل شبه كامل من جميع المكونات الخلوية باستثناء الأحماض النووية , خاصة البروتينات و Nucleases وكذلك الملوثات أو المثبطات وذلك من شأنه تحسين كفاءة تقنية PCR , حيث أن إمكانية الحصول على حمضاً نووياً خالياً من المواد

- المُثبِطَة يُعد من أكثر العوامل الحاسمة في استخدام تقنية PCR (Wilson, 1997) ,
 وأيضاً يمكن استخدام DNA المستخلص في العديد من التطبيقات الأخرى.
 • كما أنها لا تُحدِث أي ترسيب للمذيبات العضوية المستخدمة في طريقة العمل ولا أي
 ضرر للحمض النووي .

10.2 جينوم طفيلي البويغات الخبيثة *Genomics of Cryptosporidium*:

إن البحوث التي أُجريت على طفيلي البويغات الخبيثة في عصر الجينوم كانت محددة بتسلسل الجينوم الخاص بطفيلي *C.parvum* من سلالة Iowa المنشور (Abrahamsen *et al.* 2004). وكان تسلسل هذا الجينوم يغطي ما يقارب 13 طية باستخدام أسلوب shotgun Sanger , ولفترة وجيزة اقتصرت هذه العملية على عزل مجمل الحمض النووي من أكياس بيض الطفيلي *C.parvum* المصفاة وقص الحمض النووي (2-5 كيلوبايت) بشكل عشوائي وإنشاء مكتبات للبلازميد مؤلفة من 120000 نسخة معلومة التسلسل , ولتسهيل توضيح المناطق المتكررة قام الباحثون بقراءة تسلسل الجينوم بعمق ما يقارب 0.5 طية باستخدام البيانات المستمدة من إدخال (مايقارب 15 كيلوبايت) من مكتبات λ -phage المُنشأة من الحمض النووي لنفس عزلات سلالة Iowa . إن تجميع بيانات التسلسل من كلا المكتبتين كان بمساعدة خريطة فيزيائية تم انشاؤها مُسبقاً لعزلات طفيلي *C.parvum* باستخدام مايقارب 200 haploid oligonucleotides primers لتصوير القيم الأحادية المجموعة الكروموسومية amounts (بمعنى آخر خريطة HAPPY) للحمض النووي لطفيلي *C.parvum* باستخدام تقنية PCR لتحديد مناطق مُتباعدة (مايقارب 50 كيلوبايت) عن بعضها البعض (Piper *et al.* 2004 ; Abrahamsen *et al.*, 1998) ولرسم تسلسل الكروموسوم رقم 6 (Bankier *et al.*, 2003).

إن المزيج الناتج من التسلسلات الطويلة المقروءة في المكتبات ذات الإدخال الواسع ومن خريطة HAPPY بالاشتراك مع قراءة التسلسلات باستخدام تقنية Selective PCR لغلق الفجوة بين مناطق الجينوم سمحت بتجميع جينوم طفيلي *C.parvum* في كروموسوماته الثمانية ,تاركةً 5 ثغرات فيزيائية , وأظهر التجميع النهائي جينوم مضغوط جداً (تقريباً 9.1 ميكابايت) وغني بقواعد AT النتروجينية (70%) والذي يعد صغير نسبياً بالمُقارنة مع معقدات القمة apicomplexans ذات الصلة مثل : *Eimeria tenella* (تقريباً 60 ميكابايت) (Shirley Gardner *et al.*, 1994, 2000) و *Plasmodium falciparum* (تقريباً 23 ميكابايت) (Gardner *et al.*, 2000)

(2002) , وخلافاً للعديد من apicomplexans فإنه لا يتضمن جينوم المايوتوكونديريا
(Cacciò and Widmer, 2013) mitochondrial or apicoplast genomes .

إن ملاحظة أو مشاهدة جينوم طفيلي *C.parvum* كان قد تحقق في المقام الأول من
خلال التنبؤ بإطارات القراءة المفتوحة the prediction of open reading frames
(ORFs) بطول 67 حامض أميني على الأقل من تسلسل الجينوم الذي تم جمعه . وعلى الرغم
من أن أساليب تنبؤ الجين المعتمدة على أساس استخدام نماذج ماركوف الخفية hidden
Markov models ونماذج التعلم الآلي لتحليل بيانات (EST) expressed sequence tag
, واعتمدت مؤخراً على بيانات تسلسل الحمض النووي الريبي بصورة أكثر عمقاً وتفصيلاً
(Wang et al., 2009) . فإنها عُدت نهجاً موحداً لمشاريع التسلسل الجيني الحالي (Jex et
al., 2011; Young et al., 2012) .

إن بيانات EST الموسعة لأنواع طفيلي البويغات الخبيثة غير متاحة حتى الآن وتعد
تحدياً للتوالد من المراحل التطورية الداخلية Endogenous developmental stages . إشارة
لهذا فإن جينوم طفيلي *C.parvum* أظهر امتلاكه بضعاً من التسلسلات غير المشفرة
Intronic sequences وبالتالي فإن التنبؤ الأمامي المستقيم لأطارات القراءة المفتوحة the
straight-forward prediction of ORFs كان كافياً للسماح بتحديد 3,952 جيناً (لتشفير
3,807 بروتين) في طفيلي *C.parvum* , هذه الجينات كانت أقل عدداً من تلك المتوقع أن يتم
تشفيرها من قبل جينومات apicomplexans ذات الصلة مثل أنواع من *Plasmodium* :
(تقريباً 5,300 جين) (Gardner et al., 2002) , *Toxoplasma* (تقريباً 7,700 جين)
(Radke et al., 2005) و *Theileria* (تقريباً 4,000 جين) (Gardner et al., 2005) ,
والتي اقترنت بعدم وجود Introns وتسلسل محدد غير مشفر (مما يقارب 25% من الجينوم
الكلي) , وهذا يُفسر صغر حجم جينوم طفيلي *C.parvum* (Bankier et al., 2003) .

إن إتمام جينوم طفيلي *C.parvum* جاء سريعاً بعد نشر جينوم طفيلي *C.hominis*
من سلالة TU502 (Xu et al., 2004) . وكما في طفيلي *C.parvum* فإن جينوم طفيلي
C.hominis قد تمت قراءة تسلسله باستخدام طريقة Shotgun Sanger لعمق يقارب 12 طية
من مكتبة إدراج البلازميد وخلافاً لطفيلي *C.parvum* فإن الخريطة الفيزيائية كانت غير متوفرة
لطفيلي *C.hominis* بالرغم من أن الباحثين كانوا قد أنشأوا تغطية كبيرة تُقارب (7-8 أضعاف)
مكتبات كروموسوم البكتريا الصناعية (BAC) bacterial artificial chromosome لهذه
الأنواع واستخدموا خريطة HAPPY لطفيلي *C.parvum* لتوجيه التجميع . وباستخدام هذا
الأسلوب فإن جينوم طفيلي *C.hominis* يُمثل حالياً ما يُقارب 1400 منطقة متاخمة contigs
وتقريباً 300 scaffolds وبأقل من 250 فجوة . إن المحتوى الجيني لجينوم طفيلي

C.hominis يظهر مُشابهاً لذلك الموجود في طفيلي *C.parvum* مع توقع أن يُشفر الجينوم 3,994 جين (Cacciò and Widmer, 2013) .

قَدّر (Xu et al. (2004) أن 5-20% من جينات طفيلي *C.hominis* تمثل مناطق غير مُشفرة Introns مع الطرف الأعلى لهذا المدى يختلف بشكل ملحوظ عن تلك المتوقعة لطفيلي *C.parvum* , مع التأكيد على الحاجة لزيادة البحوث عن هذه الأنواع لطفيلي البويغات الخبيثة للتحقق من شرح الجينوم الخاص بها .

أظهر انتظام الجينوم لكل من *C.parvum* و *C.hominis* مدى التشابه بين النوعين (Xu et al., 2004) . وعند المقارنة وجد (Xu et al. (2004) بأن الجينومات تباينت في التسلسل بما لا يزيد عن 3-5% مع عدم وجود دليل على إدراج أو حذف أو إعادة تركيب في التسلسل . إن المجاميع المختصة لكلا الطفيليين تكون متطابقة تقريباً , حيث أن جينات طفيلي *C.parvum* وُجِدت متماثلة في طفيلي *C.hominis* وأن أقل من 50 جين لطفيلي *C.hominis* تكون غائبة بشكل واضح من طفيلي *C.parvum* وتكون مرتبطة بالثغرات المعروفة بجينوم *C.hominis* , مما يدل على أن كلا الطفيليين لديهما مسارات بيولوجية متشابهة مع وجود اختلافات في السلوك المظهري مثل : تخصص المُضيف , العدوى والأعراض والتي من الممكن ارتباطها باختلافات Transcriptomic أو بالطفرات .

11.2) الوقاية و السيطرة Prevention and Control :-

تطورت أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة لنتشر على نطاق واسع وأستطاعت مقاومة الظروف القاسية لفترة طويلة من الزمن حيث تكون مقاومة بشكل كبير للضغوط الطبيعية وللمُطهرات التي يصنعها الإنسان . ومن المحتمل أن تكون أكياس البيض قد تطورت في مجاميع منتشرة متحركة حيث كان هناك ضغط إنتخابي قوي من أجل البقاء على المدى الطويل فكانت النتيجة إنتاج أعداد هائلة من أكياس البيض التي استطاعت البقاء لفترات طويلة من الزمن (Blewett,1989) .

إن الأشخاص الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي يكونون معرضين أكثر من غيرهم لخطر الإصابة بعدوى داء البويغات الخبيثة Cryptosporidiosis . وبغياب العلاج المتخصص لمواجهة هذا الطفيلي تكون التدابير الوقائية ذات تأثير وأهمية كبيرة بالنسبة لهذه الفئة من الأشخاص , ومن بين هذه التدابير : غسل اليدين بشكل جيد , تجنب التعامل المباشر مع براز الحيوانات والإنسان , تجنب ابتلاع المياه خلال الأنشطة الترفيهية (في أحواض السباحة) والأخذ بتدابير السلامة والوقاية للتأكد من سلامة مياه الشرب من خلال غلي مياه الشرب قبل الاستخدام , حيث من الممكن التخلص من طفيلي البويغات الخبيثة إذا تم غلي المياه

لمدة دقيقة واحدة أو من خلال تصفيتها بواسطة فلاتر ذات ثقوب بحجم أقل من 1 مايكرومتر , حيث أن هذه التوصيات تم تلخيصها من قبل مراكز السيطرة على الأمراض Centers of disease control (Leav et al., 2003) .

إن المفاهيم المتعددة للوقاية من الأمراض التي تحملها المياه تتضمن حماية مصادر المياه من التلوث وحماية تجمعات مياه الأمطار بشكل عام من التلوث حيث يكون مستوى أكياس البيض متدني بشكل أكثر من مواقع استقبال مخلفات الزراعة والصرف الصحي , حيث تساعد هذه الإجراءات الوقائية على الحد من عبء عملية معالجة المياه لكن العواصف وهجرة الحيوانات أو العدوى البائية من الممكن أن تحدث أعلى درجة من أكياس البيض (Rose et al., 2002) .

1.11.2 العوامل الفيزيائية التي تختزل حيوية أكياس البيض Physical factors that -: reduce oocyst viability

حاولت الدراسات المختبرية تحديد الإنخفاض في عدد أكياس البيض الحيوية أو المعدية بعد التعرض للعديد من العوامل الفيزيائية مثل الحرارة , البرد , الإشعاع , الضغط والتجفيف . عند درجة حرارة 5°-15°م تبقى أكياس بيض الطفيلي *C.parvum* معدية بعد غسلها من البراز وحفظها بالماء لمدة 6 أشهر على الرغم من أن عدد أكياس البيض المعدية يتناقص تدريجياً ضمن المجموعة بمرور زمن الحفظ (Fayer et al.,1998) .

وعند خفض درجة حرارة الحفظ إلى ما دون 5°م أو زيادتها إلى درجة أعلى من 15°م سوف يقصر وقت بقاء حيوية أكياس البيض. إن عمر أكياس بيض الطفيلي *C.parvum* عند درجات حرارة متنوعة يكون مرتبطاً باحتياطي طاقة الكاربوهيدرات المخزون في الأبواغ وبالأجسام المتبقية كحبيبات الأمايلوبكتين Amylopectin granules والتي تستهلك بصورة أسرع عند درجة الحرارة العالية (Fayer et al.,1998 ; Jenkins et al., 2002) .

وفي طفيليات الأكريات الأخرى Coccidian فإن حبيبات الأمايلوبكتين تجهز الطاقة اللازمة لعملية الخروج من الكيس Excystation واجتياح خلية المضيف (Vetterling and Doran,1969) .

إن فقدان العدوى عند درجات الحرارة العالية مرتبط أيضاً بانخفاض محتوى ATP الناتج من الفعالية الأيضية العالية لأكياس البيض (King et al., 2005) . تصبح أكياس البيض غير معدية عند تعرضها لدرجة حرارة 64.2°م أو أكثر لمدة 5 دقائق ودرجة حرارة 72.4°م لدقيقة واحدة (Fayer,1994) . إن أكياس بيض الطفيلي *C.parvum* المعلقة في الماء والحليب كامل الدسم تصبح غير معدية للفئران عند تعرضها لدرجة حرارة 71.7°م لمدة 10,5

و15 ثانية في جهاز البسترة في المختبر (Harp *et al.*, 1996). تتمكن أكياس بيض الطفيلي *C. parvum* من الصمود بدرجات الإنجماد عند درجة حرارة -20°م أو أعلى لفترات طويلة لكنها لا تستطيع مقاومة درجة حرارة -70°م أو أقل حتى عند وجود مواد مانعة للإنجماد Cryoprotectants (Fayer and Nerad, 1996 ; Fayer, *et al.*, 1991). إن تأثير تكرار عملية الإنجماد وإذابة الجليد Freezing and thawing عند درجة -10°م على أكياس البيض الموجودة في تربة ذات محتوى مائي من 3-78% لا يختلف كثيراً عن الأكياس الموجودة عند درجة حرارة -10°م تحت الظروف الثابتة (Kato *et al.*, 2002).

2.11.2) المواد الكيميائية التي تختزل حيوية أكياس البيض Chemicals that reduce oocyst viability :-

لا تتأثر أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة عند استخدام المطهرات المختبرية مثل : 6% Sodium hypochlorite , 70% Ethanol ومجموعة من المستحضرات التجارية المستخدمة محلياً أو في تربية الحيوانات (Weir *et al.*, 2002). تم تسجيل اختزال أو القضاء على أكياس البيض المعدية للطفيلي عند تعريضها إلى 10% Formol أو إلى الأمونيا الغازي أو المائي أو إلى بيروكسيد الهيدروجين (Angus *et al.*, 1982). إن التراكيز المنخفضة للأمونيا 0.007 M تقلل بشكل كبير حيوية أكياس البيض بعد 24 ساعة من تعرضها له , كما هو محدد في التجارب المختبرية (Jenkins *et al.*, 1998). وكذلك التعرض لبيروكسيد الهيدروجين بتركيز 6% لمدة 4 دقائق أو 13 دقيقة لهيدروكسيد الأمونيوم يختزل من فعالية أكياس بيض طفيلي *C. parvum* في المزارع الخلوية لألف ضعف (Weir *et al.*, 2002).

3.11.2) العوامل البيئية والتي من المحتمل أن تخفض أعداد أكياس البيض

:- Enviromental Factors That Potentially Reduce Oocyst Numbers

التأثيرات المفيدة المحتملة في اختزال أعداد أكياس البيض التي تدخل سطح المياه كانت قد ارتبطت مع الأشربة المصقولة الخضرية (Vegetative buffer strips) (Atwill *et al.*, 2002), الأراضي الرطبة المشيدة (Thurston *et al.*, 2001 ; Nokes *et al.*, 2003 ; Karim *et al.*, 2004 ; Betancourt and Rose, 2005) والبرك (Grimason *et al.*, 1993; Araki *et al.*, 2001).

وُجدت تحت الظروف التجريبية أن الأوالي المفترسة Predaceous protozoa والدورات Rotifers الموجودة في تجاويف خاصة في مياه البحر , الأنهار , البحيرات والبرك تبتلع أكياس بيض الطفيلي *C. parvum* (Fayer *et al.*, 2000 ; Stott *et al.*, 2003).

أما ثمار البحر Shellfish بما في ذلك المحار Oysters , الرخويات Clams , بلح البحر Mussels والقواقع Cockles تقوم بتصفية المغذيات وتزيل الجزيئات الصغيرة من البيئة المائية المحيطة بها . وتم إيجاد أكياس البيض في الغلاصم والكيس الهضمي لثمار البحر في العديد من المياه العذبة ومياه المد والجزر الواقعة في شمال أمريكا وأوروبا (Fayer et al., 2004b).

12.2 تقنية تفاعل البلمرة التقليدي Polymerase chain reaction :

هي تقنية مخبرية اخترعها العالم الأمريكي كاري مولليس وزملاؤه عام 1980 وكما موضح في الشكل (2-) فإن في هذه التقنية يستخدم أنزيم DNA polymerase لتضخيم قطعة مختارة من الحمض النووي من خلال استخدام زوج من البوادي ذات تسلسل محدد من القواعد النتروجينية حيث يرتبط كل بادئ بجزء معين على شريط الحمض النووي المفرد بعد مسخ المزوج الحلزوني للحمض النووي أثناء التفاعل ومن ثم يبدأ الأنزيم بإضافة القواعد النتروجينية لأكمال الشريط المتمم لقالب الحمض النووي وبدوره يعمل كل شريط (الشريط المتمم والشريط قالب) كشريط أساس لدورة تفاعل البلمرة التالية وهكذا تتكرر هذه العملية حتى أنتهاء عدد الدورات المحددة للتفاعل وبهذه الطريقة تتم مضاعفة منطقة الحمض النووي المحددة والمراد الكشف عنها في كل دورة من دورات التفاعل حيث يتم الحصول على ملايين النسخ من مناطق الحمض النووي المحددة ومن ثم تصويرها بعد تحميلها على هلام الترحيل الكهربائي . كان كاري وزملاؤه يقومون بإضافة كمية جديدة من أنزيم DNA polymerase في كل دورة من دورات التفاعل بسبب أن هذا الأنزيم لا يتحمل درجات الحرارة العالية التي تستخدم في هذه التقنية لمسح الشريط الحلزوني للحمض النووي المستخدم حيث تصل درجة الحرارة لأكثر من 90°م , وأستمر الباحثون بإضافة كميات جديدة من هذا الأنزيم في كل مرة يستخدمون فيها هذه التقنية إلى أن تم اكتشاف أنزيم Taq polymerase وهو أنزيم موجود في بكتريا الينابيع الحارة *Thermus aquaticus* حيث يكون هذا الأنزيم مقاوماً لدرجات الحرارة العالية , حيث قام الباحثون بمزج هذا الأنزيم مع البوادي وعينة الحمض النووي المستخدمة في التفاعل لمرة واحدة في أنبوبة اختبار وغلقها جيداً ووضعها في جهاز التفاعل thermal cyler والمبرمج على تكرار دورات التفاعل مرة تلو الأخرى والمتضمنة ثلاث درجات حرارية مختلفة وهي :

1. درجة حرارة المسخ وتصل إلى درجة حرارة 95°م لفصل شريطي المزوج الحلزوني

للحمض النووي.

2. درجة حرارة الألتحام حيث تصل إلى 50°م وهي الدرجة المناسبة لأرتباط البودئ على كل شريط مفرد من الحمض النووي.

3. درجة حرارة الاضافة وتصل إلى 72°م وهي الدرجة التي يتم فيها اضافة القواعد النتروجينية لبناء الشريط المتمم للحمض النووي .

وعادةً ما يضمن التفاعل أكثر من 20 دورة وتستغرق كل دورة عدة دقائق , وبهذ تكون هذه التقنية أحدى أهم التقنيات التي ساعدت العلماء على أنتاج كمية كافية من الحمض النووي المستخدم في شتى المجالات (Weaver, 2012) .

13.2) الواسمات Ladder markers :

ويطلق عليها أيضاً الدلائل الحجمية , وهي قطع معروفة الوزن الجزيئي تستعمل في تحديد الوزن الجزيئي لنواتج البلمرة . وقديماً كانت تستعمل العاثيات البكتيرية Bacteriophages لهذا الغرض بعد تقطيعها بأنزيمات قطع خاصة مثل λ Hind III أو λ Pst I أو قطع ϕ X174 المهضومة ب HaeIII. وهذه الواسمات تعطي حجم أو وزن جزيئي تقريبي , ويتم اختيارها لتكون ملائمة للنماذج تحت الدراسة , فمثلاً لنماذج البلمرة الصغيرة تستعمل ϕ X174 HaeIII , وللقطع الكبيرة مثل 6 كيلو قاعدة يستعمل λ Hind III. وفي الوقت الحاضر انبرت الشركات في تحضير سلم من الواسمات بأوزان جزيئية مختلفة تتراوح بين 100 قاعدة وبعضها يصل إلى 10 كيلو قاعدة . وفي حالة معرفة كميات DNA في مسار Lane الواسمات يمكن حساب كمية DNA التقريبية للحزم الواضحة , وفي هذه الحالة يمكن الاستعانة ببرامج الحاسوب الكثيرة المعنية بتحليل الهلام . ويفضل أن يكون خليط الواسمات جاهزاً ومخلوط مع دارئ التحميل Loading buffer وبتركيز محدد , وعادةً يستعمل في أول مسار من مسارات الهلام والأفضل استعمال أكثر من مسار للواسمات في الهلام لزيادة دقة النتائج (الخفاجي وأبو المعالي, 2013).

14.2) قراءة تسلسل الحمض النووي DNA Sequencing :

إن مصطلح DNA Sequencing يُشير إلى طرق تحديد ترتيب القواعد النتروجينية (الأدينين , الكوانين , السايروسين والثايمين) في جزيئة الحمض النووي DNA . إن أول تسلسل للحمض النووي تم الحصول عليه في أوائل سبعينيات القرن الماضي من قبل الباحثين الأكاديميين باستخدام الطرق المختبرية ارتكزت على 2- dimensional chromatography , وبتطور طرق قراءة تسلسل الحمض النووي المُعتمدة على الصبغة أصبحت عملية القراءة أسهل وأسرع . إن معرفة تسلسل القواعد النتروجينية للجينات أو للأجزاء الأخرى من جينوم الكائنات الحية أصبح أمراً لا غنى عنه في البحوث الأساسية لدراسة العمليات البيولوجية وكذلك في

المجالات التطبيقية مثل: بحوث التشخيص أو الطب الشرعي . إن الغرض الرئيسي من استخدام طرق قراءة تسلسل الحمض النووي هو لتقييم التسلسل بدقة عالية جداً مما يُتيح معرفة السبب الرئيسي لمختلف الأمراض وبالتالي يُمهد لإمكانية استخدام العلاج الجيني لعلاجها بعد تحديد التسلسل المسؤول عن حدوث هذه الأمراض (Bharti, 2012) .

: Materials (1.3)

: Chemicals materials (1.1.3) المستخدمة

اسم المادة	ت
Distilled Water	1 ماء مقطر
Carbolfuchsin Stain	2 صبغة كاربول فوكسين
Potassium Dichromate Powder	3 مسحوق ثنائي كرومات البوتاسيوم
Malachite Green Stain	4 صبغة الملاكايت الخضراء
Methylen Blue Stain	5 صبغة الميثيلين الزرقاء
Ethyl Alcohol	6 كحول أثيلي
Sulfuric Acid	7 حامض الكبريتيك
AccuPrep® Stool Genomic DNA Extraction kit	8 مجموعة استخلاص الحمض النووي
Isopropanol Alcohol	9 كحول الأيزوبروبانول
Agarose Powder	10 مسحوق الآكاروز
Tris/Borate/EDTA Buffer	11 محلول TBE
Ethidium Bromide	12 صبغة الاثديوم برومايد
DNA Ladder	13 واسمات
Master Mix	14 خليط رئيسي
Primers	15 زوج من البودئ

جدول (1-3) المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة.

: Apparatus and equipments (2.1.3) المستخدمة

اسم الأداة/الجهاز	ت
Tubes	1 شرائح زجاجية
Plastic Containers	2 قناني بلاستيكية
Wood Sticks	3 أعواد خشبية
Tubes 10 ml	4 أنابيب اختبار سعة 10 ml
Microscope	5 مجهر ضوئي

Centrifuge	جهاز طرد مركزي	6
Vortex	جهاز رجاج	7
Incubator	حاضنة	8
Spectrophotometre	جهاز التحليل الطيفي	9
Electrophoresis	جهاز الترحيل الكهربائي	10
UV Solo TS Imaging System	جهاز لتصوير الهلام	11

جدول (2-3) الأجهزة والادوات المستخدمة في الدراسة.

2.3 جمع العينات samples collection:

تم جمع 77 عينة براز من أطفال بعمر 3 أشهر - 12 سنة وأشخاص بالغين بعمر 18 سنة-33 سنة ومن كلا الجنسين (ذكور، اناث) يعانون من إلتهاب المعدة والأمعاء ومن الإسهال والراقدين في مستشفى آزادي التعليمي في محافظة دهوك والمراجعين لكل من المراكز الصحية في قضاء بردرش (مركز الخازر الصحي ومركز بردرش الصحي) التابع لمحافظة دهوك في الفترة من بداية شهر كانون الثاني 2016 وحتى نهاية شهر تموز 2016 , ويقع القضاء في جنوب شرق محافظة دهوك ويمتاز بكونه مدينة صغيرة محاطة بقرى ونواحي يعتمد سكانها على تربية المواشي والزراعة واستخدام مياه الآبار في السقي وقضاء حوائجهم اليومية من شرب وغسل , تم إعطاء ذوي الأطفال والمراجعين قناني بلاستيكية نظيفة ومرقمة لجمع العينات مسجل عليها عمر وجنس كل طفل أو شخص مصاب وتأريخ جمع العينة , وقد تم تقسيم العينات إلى مجموعتين:

المجموعة الأولى: عينات محفوظة في محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم Potassium dichromate solution بتركيز 2.5% (المحضر بإذابة 25 غم من ثنائي كرومات البوتاسيوم في لتر ماء مقطر) والبالغ عددها 41 عينة , حيث أن محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم يُساعد على الحفاظ على حيوية أكياس بيض الطفيلي لمدة طويلة وكذلك لا يؤثر على كفاءة تطبيق تقنيات البايولوجي الجزيئي ومن ضمنها تقنية PCR على العكس من استخدام مادة الفورمالين كمادة حافظة للعينات والتي تُعد مُثبطات قوية للتقنيات الجزيئية وخصوصاً تفاعل PCR

(Smith, 2008 ; Lalonde and Gajadhar, 2009) , وتم نقل العينات بصندوق حاوي على

الثلج إلى المختبر لاستخلاص DNA وإجراء فحص تفاعل البلمرة PCR.

المجموعة الثانية: عينات حُفظت في الثلجة بدرجة حرارة (4م°) لمدة لا تزيد عن اسبوع أو اسبوعين والبالغ عددها 36 عينة , وأيضاً تم نقل هذه العينات بصندوق حاوي على الثلج إلى

المختبر لاستخلاص DNA وإجراء فحص تفاعل البلمرة PCR .

تم عمل الشرائح وتصبيغها بصبغة الزيل نلسن Modified Zeihl Neelsen Stain وفحص العينات في مختبرات المراكز الصحية المذكورة أعلاه بينما تم استخلاص DNA عينات البراز وتطبيق تقنية تفاعل البلمرة التقليدي Conventional PCR في مختبرات Genome Diagnosis Lab (GDL) الأهلية في أربيل. تم إجراء هذا الجزء من الدراسة لتقييم العلاقة بين انتشار الطفيلي وبعض العوامل وعلى النحو التالي :

العدد الكلي للعينات	إناث				ذكور			الجنس
	40				37			
77	8 سنوات-33 سنة		3 سنوات-7 سنوات		3 أشهر-2 سنة			العمر
	21		23		33			
77	طبيعي				إسهال			حالة البراز
	44				33			
77	تموز	حزيران	أيار	نيسان	آذار	شباط	كانون الثاني	فترة الدراسة
	10	10	11	14	10	11	11	

3.3 التحري عن أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة:

لغرض الكشف عن أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة , تم فحص كل عينة براز بطريقة عمل المسحات المصبوغة بصبغة الزيل نلسن المحورة Modified Zeihl Neelsen Stain (ZN STAIN KIT من شركة Atom scientific) استناداً إلى (الجرجي, 2006) وباستخدام صبغتين تفرقتين لكل مسحة معدة وهذه الصبغات هي صبغة (Methylen Blue من شركة Atom scientific وصبغة Malachite green oxalate من شركة Scharlau الإسبانية) , وتطبيق فحص تفاعل البلمرة التقليدي Conventional PCR بعد استخلاص DNA من عينات البراز.

تم عدّ العينات المفحوصة موجبة عند ظهور نتيجة إيجابية في الفحوصات المستخدمة في الدراسة أو في أحدها عند الكشف والتحري عن وجود أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* في كل عينة براز.

4.3 طريقة تحضير الشرائح وتصبيغها بصبغة الزيل نلسن:

فحصت كل عينة برارز بطريقة عمل المسحات المصبوغة بصبغة الزيل نلسن المحورة Modified Zeihl Neelsen Stain , حيث غُسلت كل عينة برارز بالماء المقطر قبل عمل المسحة لغرض التخلص من المادة الحافظة (ثنائي كرومات البوتاسيوم) , وذلك من خلال أخذ كمية قليلة من العينة المحفوظة في محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم ووضعها في إنبوبة اختبار سعة 10 مل مع الماء المقطر ووضعها في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة 5 دقائق وبسرعة 4400 دورة/دقيقة , كررت هذه العملية ثلاث مرات لكل عينة حتى يتم التأكد من أنه تم التخلص من المحلول .

- أخذت كمية من البرارز بأعواد خشبية بقدر رأس عود ثقاب وفُرشت على شريحتين زجاجيتين نظيفتين وتركت لتجف على الهواء دون استخدام اللهب.
- ثُبتت المسحة باستخدام الكحول الأيثيلي المطلق لمدة 5 دقائق وتركت لتجف.
- صُبغت الشريحتين بصبغة الكاربول فوكسين الحمراء لمدة 15 دقيقة.
- غُسلت الشريحتين بماء الحنفية.
- أُضيف حامض الكبريتيك بتركيز 2% للشريحة لمدة 20 ثانية.
- غُسلت الشريحتين مرة أخرى بماء الحنفية.
- صُبغت إحدى الشريحتين بصبغة المالاكايت الخضراء Malachite Green لمدة خمس دقائق (والمُحضّرة بإذابة 5 غرام من الصبغة في 100 مل من الماء المقطر) وصُبغت الشريحة الأخرى لنفس العينة بصبغة المثلين لمدة خمس دقائق .
- غُسلت الشريحتين بماء الحنفية ثم تُركت لتجف وفُحصت تحت المجهر بقوة 40X ومن ثم تحت العدسة الزيتية 100X.



شكل (1-3) Modified Zeihl Neelsen Stain Kit من شركة Atom scientific

5.3 دراسة جزيئية Molecular Study :

1.5.3 استخراج الحمض النووي من عينة البراز Stool DNA Extraction :

من أجل إجراء فحص البلمرة التقليدي Conventional PCR لعينات البراز تم استخراج الحمض النووي لطفي البويغات الخبيثة *Cryptosporidium parvum* وذلك من خلال استخدام AccuPrep® Stool Genomic DNA Extraction kit من شركة (Bioneer, Korea) , تم غسل العينات المحفوظة في محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم قبل إجراء عملية الاستخلاص من خلال إجراء نفس خطوات الغسل المذكورة سابقاً مع اختلاف أنه تم أخذ كمية قليلة من العينة ووضعت في Microcentrifuge tube وإضيفت لها كمية من الماء المقطر وأجري طرد مركزي للعينة بسرعة 13000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق والتخلص من المادة العالقة والاحتفاظ بالراسب بعد كل عملية طرد مركزي , حيث كررت هذه العملية لخمس مرات .

تمت عملية استخلاص DNA لمجموعة من العينات تبعاً لتعليمات الشركة المُجهزة وكما هو مبين في الخطوات التالية:

- أضيف 20µl من محلول Proteinase K إلى أنبوب نظيف سعة 1.5 مل .
- أضيف حوالي 100-200 مليغرام من عينة البراز لكل أنبوب حاوي على Proteinase K.

- ثم أضيف 400µl من محلول Stool lysis buffer (SL) إلى العينة ومزجت مباشرة بشكل جيد بواسطة جهاز Vortex حتى غلقت كل كمية العينة في المحلول .
 - وُضعت العينة في الحاضنة بدرجة حرارة 60°م ولمدة 10 دقائق .
 - أُجري طرد مركزي للعينة بسرعة 12000 دورة/دقيقة ولمدة 5 دقائق , ثم نُقل العالق إلى أنبوب جديد.
 - تم إضافة 400µl من محلول Binding buffer إلى العينة .
 - كررت عملية التحضين مرة أخرى بدرجة 60°م ولمدة 10 دقائق .
 - أُضيفَ 100µl من Isopropanol إلى العينة ومُزجت بجهاز Vortex لمدة 5 ثواني.
 - أستخدم أنبوب جمع جديد نظيف سعة 2 مل حاوي على Binding column , حيث تم نقل السائل إليه .
 - تم غلق الأنبوب بشكل محكم وعمل طرد مركزي للعينة بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .
 - تم نقل Binding column إلى أنبوب جديد سعة 2 مل وأضيف إليه 500µl من Washing buffer 1 (W1) لغسل العينة وإجراء طرد مركزي لها بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .
 - نقل Binding column مرة أخرى إلى أنبوب جديد سعة 2 مل وعمل خطوة ثانية للغسل من خلال إضافة 500µl من محلول Washing buffer 2 (W2) وأيضاً عمل طرد مركزي للعينة بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .
 - كُررت عملية الطرد المركزي مرة ثانية للتأكد من إزالة جميع الإيثانول من الفلتر وعدم وجود أي بقايا من محلول الغسل الثاني Washing buffer 2 .
 - نقل Binding column tube إلى أنبوب جديد ونظيف سعة 1.5 مل وأضيف 200µl من Elution buffer وثركت العينة لمدة دقيقة واحدة ليتم امتصاص Elution buffer بشكل كامل في سيليكاً أنبوب Binding column .
 - أُجري طرد مركزي أخير للعينة بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .
- ونتيجةً لقلّة تراكيز الأحماض النووية المُستخلصة وعدم ظهور أي حزمة في الآكاروز قُمنّا بعمل عدة تحويلات على طريقة عمل الشركة المُجهزة لمجموعة الاستخلاص , حيث لم تكن خطوات الشركة كافية لاستخلاص الحمض النووي وجاء هذا متوافقاً مع ما ذكره (Hawash, 2014) , وكانت هذه التحويلات على مجموعتين وكالاتي:

ت	مجموعة التحويلات الأولى	ت	مجموعة التحويلات الثانية
-1	أضيف 40µl من محلول Proteinase K إلى أنبوب نظيف سعة 1.5 مل .	-1	إضافة 40µl من محلول Proteinase k لكل تيوب نظيف سعة 1.5 مل حاوي على عينة براز لا يزيد وزنها عن 100 ملغم.
-2	أضيف حوالي 100-200 مليغرام من عينة البراز لكل أنبوب حاوي على Proteinase K.	-2	أضيف 400µl من محلول Stool lysis buffer إلى العينة ومزجت مباشرة بشكل جيد بواسطة جهاز Vortex حتى غلقت كل كمية العينة في المحلول .
-3	أضيف 400µl من محلول Stool lysis buffer إلى العينة ومزجت مباشرة بشكل جيد بواسطة جهاز Vortex حتى غلقت كل كمية العينة في المحلول .	-3	مزجت كل المكونات بشكل جيد جداً بواسطة جهاز Vortex ولمدة 3 دقائق حتى تصبح كل عينة البراز سائلة إن كانت عينة البراز صلبة .
-4	وُضعت العينة في الحاضنة بدرجة حرارة 60°م ولمدة 10 دقائق .	-4	وضعت العينة في الحاضنة بدرجة حرارة 65°م ولمدة 10 دقائق وأجري طرد مركزي للعينة بسرعة 12000 دورة/دقيقة ولمدة 5 دقائق , ثم نُقل العالق إلى أنبوب جديد.
-5	أجري طرد مركزي للعينة بسرعة 12000 دورة/دقيقة ولمدة 5 دقائق , ثم نُقل العالق إلى أنبوب جديد.	-4	وضعت العينة في الحاضنة بدرجة حرارة 65°م ولمدة 10 دقائق وأجري طرد مركزي للعينة بسرعة 12000 دورة/دقيقة ولمدة 5 دقائق , فإذا كان هناك أية شوائب أو ألياف في العينة نقوم بعمل طرد مركزي ثاني وبالسرعة القصوى للجهاز ولمدة دقيقتين.
-6	تم إضافة 400µl من محلول Binding buffer إلى العينة .	-5	تم إضافة 400µl من محلول Binding buffer إلى العينة .
-7	كررت عملية التحضين مرة أخرى بدرجة 60°م ولمدة 10 دقائق .	-5	تم إضافة 400µl من محلول Binding buffer إلى العينة .
-8	أضيف 100µl من Isopropanol إلى العينة ومُزجت بجهاز Vortex لمدة 5 ثواني.	-6	كررت عملية التحضين مرة أخرى بدرجة 65°م ولمدة 10 دقائق .
-9	أستخدم أنبوب جمع جديد نظيف سعة 2 مل حاوي على Binding column , حيث تم نقل السائل إليه .	-7	وضعت العينة في المجمدة لمدة 5 دقائق.
-10	تم غلق الأنبوب بشكل محكم وعمل طرد مركزي للعينة بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .	-8	أضيف 100µl من محلول Isopropanol المبرّد للعينة ومزج العينة على السرعة المتوسطة لجهاز vortex ولمدة 5 ثواني.
-11	تم نقل Binding column إلى أنبوب جديد سعة 2 مل وأضيف إليه 500µl من Washing buffer 1 لغسل العينة وعمل طرد مركزي لها بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .	-9	أستخدم أنبوب جمع جديد نظيف سعة 2 مل حاوي على Binding column , حيث تم نقل السائل إليه .
-12	نقل Binding column مرة أخرى إلى أنبوب جديد سعة 2 مل وعمل خطوة ثانية	-10	تم غلق الأنبوب بشكل محكم وعمل طرد مركزي للعينة بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .
		-11	تم نقل Binding column إلى أنبوب

<p>جديد سعة 2 مل وأضيف إليه 500µl من Washing buffer 1 لغسل العينة وعمل طرد مركزي لها بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .</p>		<p>لغسل من خلال إضافة 500µl من محلول Washing buffer 2 وأيضاً عمل طرد مركزي للعينة بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .</p>	
<p>نقل Binding column مرة أخرى إلى أنبوب جديد سعة 2 مل وعمل خطوة ثانية للغسل من خلال إضافة 500µl من محلول Washing buffer 2 وأيضاً عمل طرد مركزي للعينة بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .</p>	<p>-12</p>	<p>كُريت عملية الطرد المركزي مرة ثانية للتأكد من إزالة جميع الإيثانول من الفلتر وعدم وجود أي بقايا من محلول الغسل الثاني Washing buffer 2 .</p>	<p>-13</p>
<p>كُريت عملية الطرد المركزي مرة ثانية للتأكد من إزالة جميع الإيثانول من الفلتر وعدم وجود أي بقايا من محلول الغسل الثاني Washing buffer 2 .</p>	<p>-13</p>	<p>نقل Binding column tube إلى أنبوب جديد ونظيف سعة 1.5 مل وأضيف 50µl من Elution buffer وثركت العينة لمدة 5 دقائق ليتم امتصاص Elution buffer بشكل كامل في سيليكا أنبوب Binding column .</p>	<p>-14</p>
<p>نقل Binding column tube إلى أنبوب جديد ونظيف سعة 1.5 مل وأضيف 50µl من Elution buffer وثركت العينة لمدة 5 دقائق ليتم امتصاص Elution buffer بشكل كامل في سيليكا أنبوب Binding column .</p>	<p>-14</p>	<p>أجري طرد مركزي للعينة بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .</p>	<p>-15</p>
<p>تم إعادة السائل الراسب بعد عملية الطرد المركزي الأخيرة إلى نفس spin column وأجري طرد مركزي آخر للعينة مباشرة وبسرعة 12000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .</p>	<p>-16</p>	<p>تم إعادة السائل الراسب بعد عملية الطرد المركزي الأخيرة إلى نفس spin column وأجري طرد مركزي آخر للعينة مباشرة وبسرعة 12000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .</p>	<p>-16</p>

حيث عندما تم تطبيق المجموعة الأولى من التحويلات لم تظهر أي حزمة للأحماض النووية عند تحميلها في هلام الأكاروز لذلك تم تطبيق مجموعة التحويلات الثانية حيث تم الحصول على حزم لبعض الأحماض النووية عند تحميلها في الأكاروز كما يظهر في شكل (4-7) .
وبذلك تكون عينة DNA جاهزة للاستخدام في تفاعل البلمرة التقليدي Conventional PCR أو يتم حفظها بدرجة حرارة -20م عند خزنها لفترات طويلة .

تم قياس تركيز ونقاوة DNA في العينة بواسطة جهاز Nanodrop وبطول موجي 260/280 nm . ولغرض التأكد أكثر من وجود DNA في العينة بالإضافة إلى قياس تركيزها بجهاز Nanodrop تم عمل ترحيل كهربائي لكل عينة وملاحظة الحزم وتركيزها بهلام الآكاروز.



شكل (2-3) AccuPrep® Stool Genomic DNA Extraction kit من شركة (Bioneer, Korea)



شكل (4-3) جهاز Nanodrop (من نوع Implen)



شكل (3-3) Proteinase K



شكل (3-6) جهاز تصوير هلام الآكاروز UV solo

Biometra من شركة TS Imaging system



شكل (3-5) جهاز الترحيل الكهربائي

Electrophoresis

2.5.3 (2.5.3) تفاعل البلمرة التقليدي Conventional PCR :

تم تطبيق فحص PCR على عينات DNA التي تم الحصول عليها من عملية استخلاص DNA من عينات البراز للأشخاص المراد التأكد من إصابتهم بطفيلي البويغات الخبيثة *Cryptosporidium parvum* حيث تم استخدام 3 أنواع من الخليط الرئيسي Mastermix من 3 شركات مختلفة وهي :

- 5x HOT FIREPol®Blend Master Mix من شركة (Solis BioDyne).
- Speed ready mix plus (300 µl) من شركة (analytikjena).
- Prime Taq Premix (2X) من شركة (GeNet Bio).

حيث تختلف هذه المحاليل بتركيز المواد التي تتكون منها وهي :

- Prime Taq DNA Polymerase 1 unit/10µl
- Tris-HCl (pH 9.0)
- 2x reaction buffer
- Enzyme stabilizer
- 4 mM MgCl₂
- sediment
- loading dye
- PH 9.0 and 0.5 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP

وكذلك حددت وحدات جين الرنا الرايبوسومي الصغيرة Small subunit rRNA gene

(SSU rRNA) كهدف مراد تضخيمه في هذه الدراسة , بسبب كون هذا الهدف يستخدم بشكل

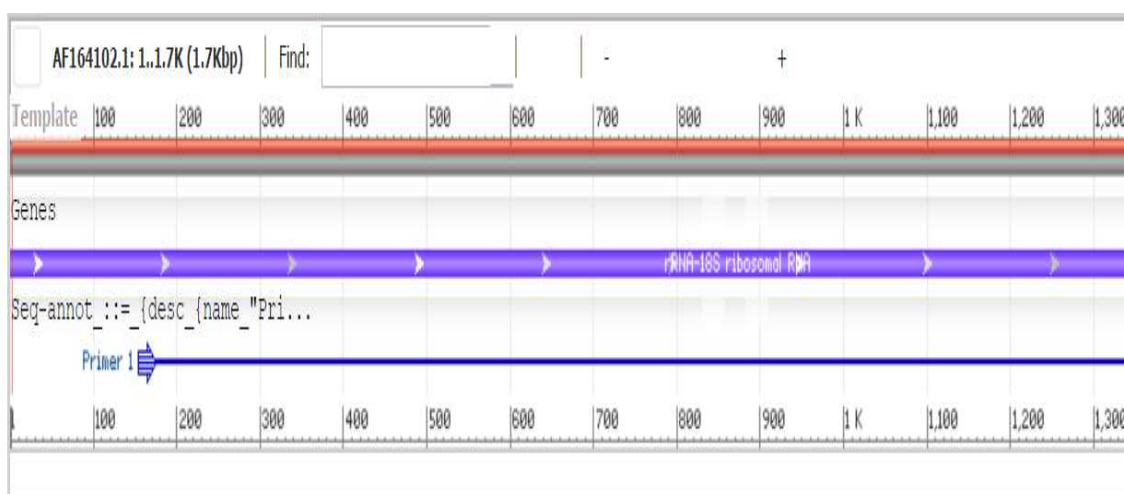
عام للكشف عن الأنماط الوراثية لطفيليات البويغات الخبيثة في الإنسان (Limor et al . ,)

البيودائ Primers التالية :
 (Xiao, 2010 ; Sulaiman *et al.* , 2005 ; 2002). ولغرض تطبيق PCR تم استخدام

❖ SSU-F2: 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3'

❖ SSU-R2: 5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'

وهي بيودائ متخصصة لطفيليات البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* sp شكل (3-7 و 3-7) للحصول على Amplicon بحجم ~ 1325 قاعدة نروجينية (Xiao *et al.*, 1999a), وقد تم تجهيز هذه البيودائ من شركة Macrogen الكورية.



شكل (3-7) عرض تخطيطي يبين طول سلسلة الحمض النووي الذي يغطيه زوج البيودائ المستخدمة في الدراسة (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/5916197?report=graph>).

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTCTAGAGCTAATACATGCG	Plus	20	155	174	52.36	40.00	6.00	2.00
Reverse primer	CCCATTTCTTCGAAACAGGA	Minus	21	1473	1453	58.21	47.62	6.00	2.00
Internal oligo		Plus							
Product length	1319								
Product Tm									
Product Tm -									

شكل (3-8) بعض المعلومات عن البيودائ المستخدمة في الدراسة
 (www.ncbi.com)

تم تهيئة العينة للفحص بشكل نهائي من خلال إضافة الأحجام التالية إلى الأنبوب الخاص بالفحص:

- 10µl من محلول Mastermix PCR.
 - 1µl من Forward primer.
 - 1µl Reverse primer.
 - 3µl من عينة DNA.
 - 5µl من ماء من نوع DNase, RNase-free water.
- وبذلك أصبح الحجم النهائي للعينة 20µl لعملية تضخيم قطعة الحمض النووي المُستهدفة , تم إجراء هذه العملية في جهاز T100 Thermal Cycler من شركة (BIO-RAD) .
- استخدمت البودائى المذكورة أعلاه بتركيز تتراوح بين 0.1- 0.2 µM , حيث حضرت هذه التراكيز من خلال تطبيق قانون التخفيف على Stock primer المجهز من قبل الشركة و كالآتي:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$100 \times V1 = 10 \times 100$$

$$V1 = 10 \mu l$$

أخذ 10µl من Stock primer وخفف في 90µl من الماء المقطر وبذلك حضر primer بتركيز 0.1µM وأخذ 1µl من كل primer عند تحضير عينة DNA لتفاعل PCR عند استخدام هذا التركيز ويكون حجم الماء المقطر 5µl لغرض إكمال الحجم النهائي لعينة PCR, أما عند استخدام primer بتركيز 0.2 µM عند التطبيق فنقوم بأخذ 2µl من كل primer وإضافته للعينة ويكون حجم الماء المقطر 3 µl.

إن تحديد ظروف تفاعل PCR مثل زمن التفاعل , الحرارة وحجم عينة DNA تختلف من فحص إلى آخر وتحدد تبعاً لنوع الهدف المراد تضخيمه , وقد تم إعداد وتطبيق ظروف تفاعل PCR كما هو مُثبت في جدول (3-3) (<http://www.genetbio.co.kr/en/index.html>):

العملية	درجة الحرارة	الوقت المطلوب	عدد الدورات
Initial denaturation	95°C	5 دقائق	دورة واحدة
Denaturation	95°C	30 ثانية	45 دورة
Annealing	60°C	30 ثانية	
Elongation	72°C	دقيقة واحدة	
Final elongation	72°C	5 دقائق	دورة واحدة

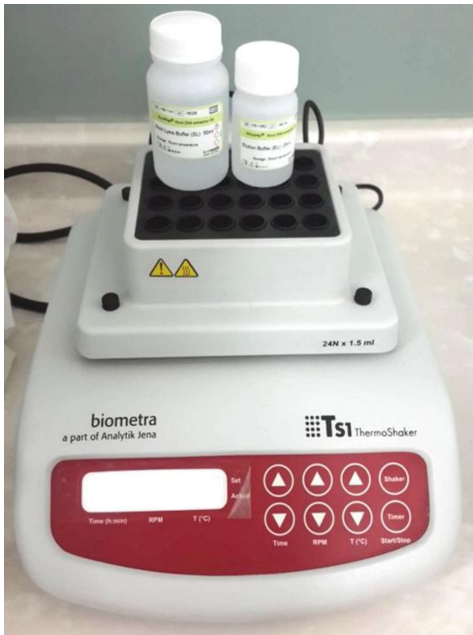
جدول (3-3) ظروف تفاعل PCR .



شكل (3-10) الخليط الرئيسي Master Mix من نوع Prime Taq premix(2x) من شركة



شكل (3-9) البودائ Primers من شركة Macrogen الكورية



شكل (3-12) حاضنة من نوع Biometra TS1 thermoshaker



شكل (3-11) جهاز T100 Thermal Cycler من شركة (BIO-RAD) Cyclor

6.3) الترحيل الكهربائي Electrophoresis :

تم عمل ترحيل كهربائي لنواتج عملية PCR لغرض معرفة هل تمت عملية تضخيم قطعة الحمض النووي المراد الكشف عنها أم لا وبذلك يُتاح لنا معرفة فيما إذا كانت نتيجة العينة موجبة

أم سالبة , وقد تم عمل الترحيل الكهربائي باستخدام هلام بتركيز 2% وتم تحضيره كما هو موضح بالخطوات التالية :

- تم وزن 2غم من مادة الآكاروز وإذابته في محلول مكون من {90 مل من الماء المقطر + 10 مل من محلول (TBE) (Tris/Borate/EDTA buffer) } ورج جيدا لعدة ثواني.
- وضع المحلول في جهاز المايكرويف بدرجة حرارة 80°م ولمدة دقيقتين مع الدوران المستمر.
- برّد المحلول قليلاً بماء الحنفية وإضافة 1µl من صبغة Ethidium Bromide ومزج جيداً وصب في الوعاء الخاص بالهلام وثرّك لفترة حتى يتصلب مع ملاحظة وجوب التخلص من أي فقاعة فيه قبل أن يتصلب.
- ومن جهة أخرى تم تحضير محلول التحميل من خلال تخفيف 100 مل من محلول TBE في 900 مل من الماء المقطر. ثم تم سكبهِ بوعاء التحميل بحيث يغطي جميع الجل المحضّر.
- وضعت عينات DNA في الحفر المخصصة لها بعد إضافة DNA loading لها وكذلك تم وضع DNA ladder في إحدى الحفر لقياس الوزن الجزيئي لعينة DNA . بعد ذلك تم تشغيل جهاز الترحيل الكهربائي بعد ضبط الجهاز على 150 v ولمدة 45 دقيقة .

7.3 تصوير الحزم في هلام الآكاروز :

تم التقاط صور لحزم الحمض النووي المرّحل بالجل بواسطة جهاز UV solo TS Imaging system من شركة Biometra.

8.3 تحليل تسلسل الحمض النووي DNA sequencing analysis :

تم اختيار ثلاث عينات من نواتج تفاعل البلمرة التقليدي والتي أظهرت نتيجة موجبة للمنطقة المُستهدفة من الحمض النووي لطفيلي البويغات الخبيثة وارسالها إلى شركة GeNet Bio في كوريا الجنوبية لمعرفة مدى تطابق تسلسل الحمض النووي للنواتج مع التسلسل الرئيسي للحمض النووي لطفيلي *Cryptosporidium* reference gene والمنشور في قاعدة بيانات القواعد النروجينية في موقع GenBank باستخدام BLAST program of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

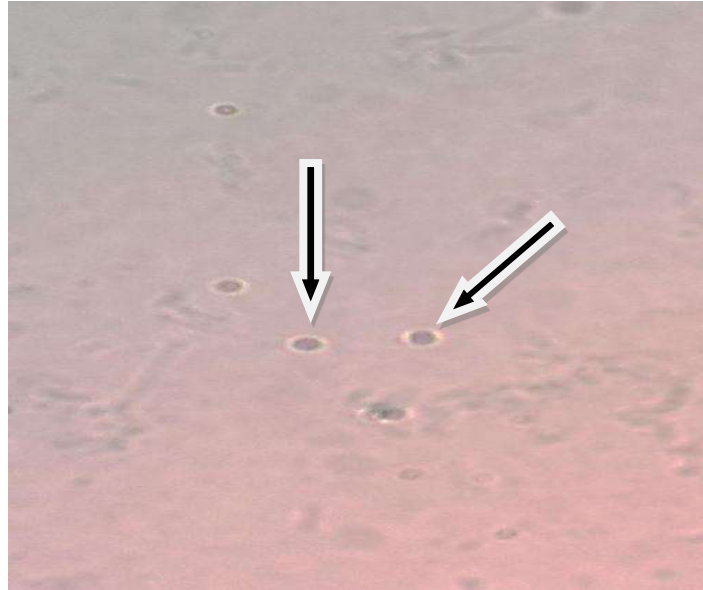
9.3) الواسمات Ladder markers :

تم استخدام واسمات جاهزة مصنعة من شركة Jena Bioscience الألمانية وذات وزن جزيئي متوسط Mid Range DNA Ladder حيث يتراوح وزنها الجزيئي من 100 قاعدة إلى 3000 قاعدة نروجينية .

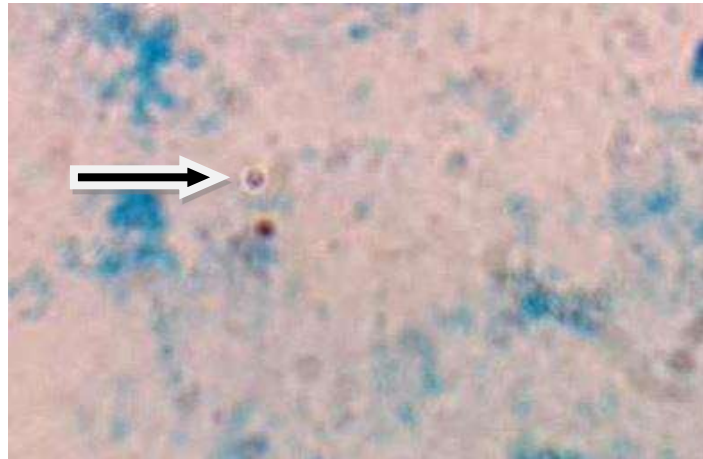
10.3) آلية احتساب نسب الإصابة :

تم اعتماد اختبار T-test في تحليل النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة وباستخدام برنامج التحليل الإحصائي SPSS statistics إصدار 23 , حيث تم اعتبار القيم التي تم تحليلها ذات أهمية عندما كانت قيمة الفرق المعنوي P-value أقل من 0.05

شوهدت أكياس بيض طفيلي البويضات الخبيثة في عينات البراز المصبوغة بصبغة الزيل نلسن المحورة وباستخدام صبغتي الملاكايت الخضراء Malachite green oxalate والميثيلين الزرقاء Methylene Blue كصبغتين تفرقتين , حيث لم يتم ملاحظة وجود فرق في القراءة بين المسحات المصبوغة بصبغة الملاكايت الخضراء وصبغة الميثيلين الزرقاء . ظهرت أكياس الطفيلي بشكل كروي أو بيضوي ومصبوغة بلون أحمر أو وردي ومحاطة بهالة شفافة مميزة (شكل 1-4 و 2-4).



شكل (1-4) أكياس طفيلي البويضات الخبيثة في مسحة براز الإنسان والمصبوغة بصبغة الزيل نلسن وباستخدام صبغة الملاكايت الخضراء كصبغة تفرقية وتحت عدسة بقوة تكبير X 1000.

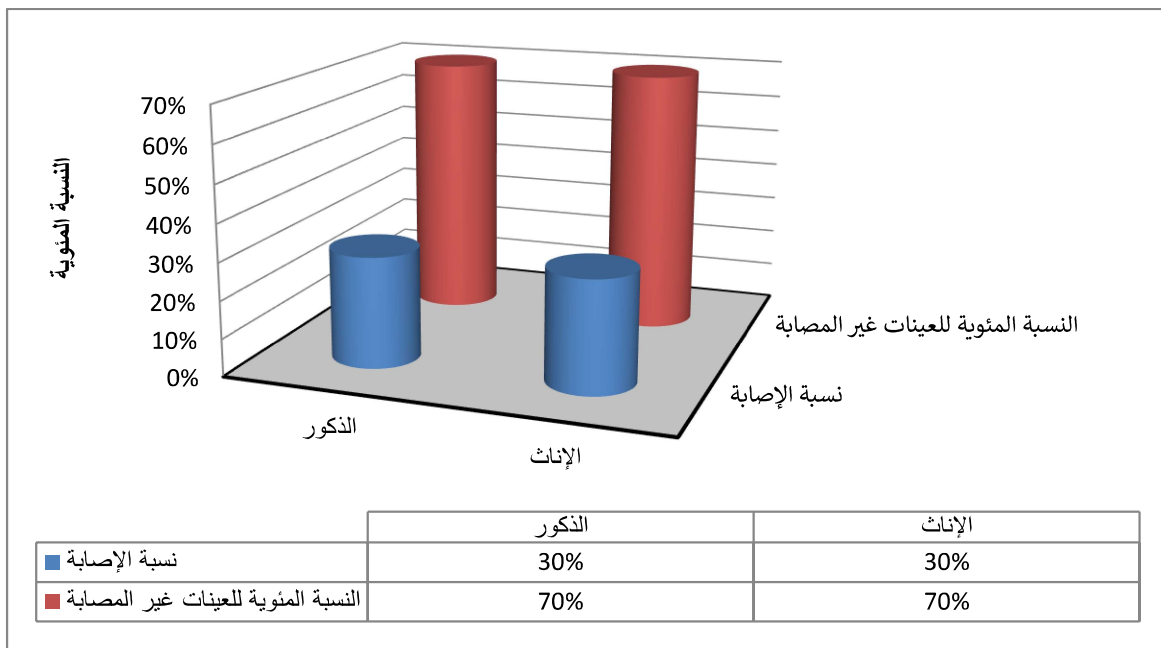


شكل (2-4) أكياس طفيلي البويضات الخبيثة في مسحة براز الإنسان والمصبوغة بصبغة الزيل نلسن وباستخدام صبغة الميثيلين الزرقاء كصبغة تفرقية وتحت عدسة بقوة تكبير X 1000.

أظهرت نتائج فحص العينات والبالغ عددها 77 عينة براز والتي تم صبغها بصبغة الزيل نلسن المحورة حدوث الخمج بطفيلي البويغات الخبيثة في 23 طفلاً ومن كلا الجنسين وبنسبة (29.87%) , وكانت نسبة الإصابة متقاربة جداً بين الذكور والإناث حيث بلغت نسبة إصابة الذكور (29.72%) بينما كانت الإصابة بين الإناث بنسبة (30%) ويفارق معنوي ($P < 0.05$) وكما مبين في جدول (1-4) وبالشكل (3-4).

ت	الجنس	عدد العينات المصابة	عدد العينات غير المصابة	العدد الكلي	نسبة الإصابة %
1-	الذكور	11	26	37	29.72%
2-	الإناث	12	28	40	30%
	المجموع	23	54	77	29.86%

جدول (1-4) يوضح انتشار طفيلي البويغات الخبيثة بين الإناث والذكور.



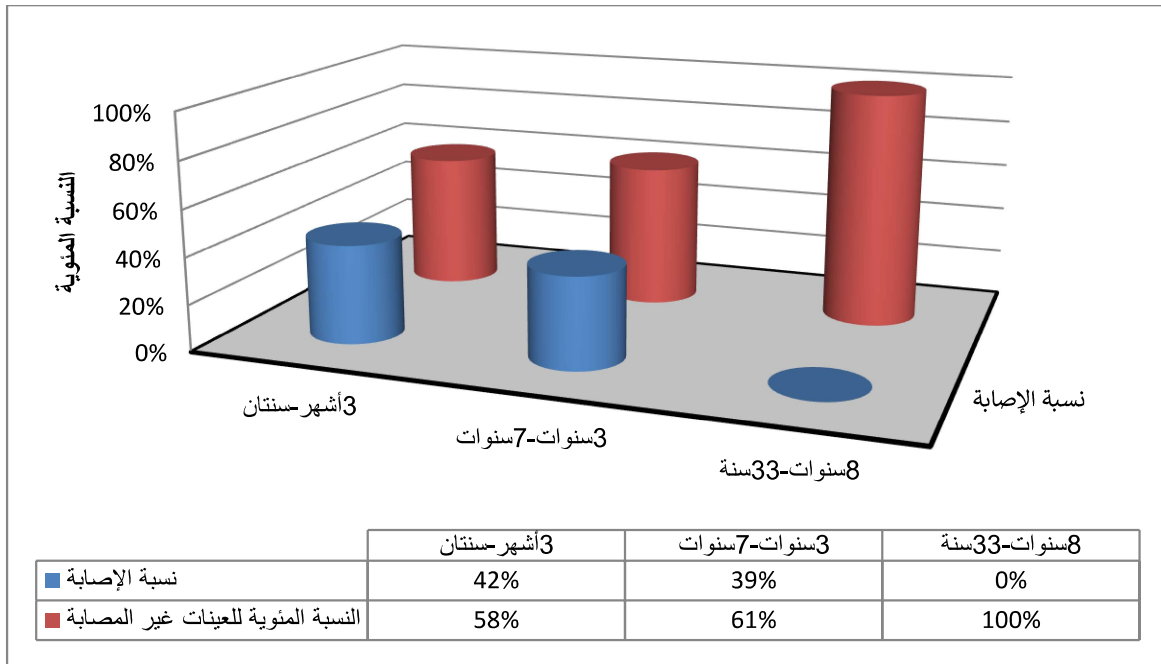
شكل (3-4) مخطط بياني يوضح نسبة الإصابة بداء البويغات الخبيثة بين الذكور والإناث خلال مدة إجراء البحث.

لم تُسجل أي إصابة في مركز مدينة دهوك حيث اقتصر جمع العينات على المرضى الراقدين في مستشفى آزادي التعليمي والذين كانت أعمارهم تزيد عن 10 سنوات ومن كلا الجنسين ,

أما في قضاء بردرش ونواحيه أيضاً لم يُسجل وجود أية إصابة بين الأطفال والأشخاص فوق سن 7 سنوات وكانت الإصابة محصورة فقط بين الأطفال الذين تراوحت أعمارهم بين (3 أشهر - 7 سنوات) ومن كلا الجنسين , حيث كانت نسبة الإصابة للأطفال في الفئة العمرية (3 أشهر - سنتان) (42.42%) لكلا الجنسين وبنسبة (39.13%) للأطفال بعمر (3 سنوات - 7 سنوات) لكلا الجنسين ولم يسجل أي فارق معنوي , حيث سُجلت إصابة واحدة بين الإناث بعمر 7 سنوات وبنسبة (2.5%) حيث كان عدد الإصابات يتناقص بتزايد العمر لذلك لم يتم تسجيل أي إصابة بالطفيلي في الأطفال والبالغين والذين تراوحت أعمارهم بين (8 سنوات - 33 سنة) وكما مبين بجدول (4-2) وشكل (4-4).

ت	الفئات العمرية	عدد العينات المصابة	عدد العينات غير المصابة	العدد الكلي	نسبة الإصابة %
1-	3 أشهر - سنتان	14	19	33	42.42%
2-	3 سنوات - 7 سنوات	9	14	23	39.13%
3-	8 سنوات - 33 سنة	0	21	21	0%
	المجموع	23	54	77	27.18%

جدول (4-2) يوضح انتشار طفيلي البويغات الخبيثة بين الفئات العمرية المختلفة لكلا الجنسين.

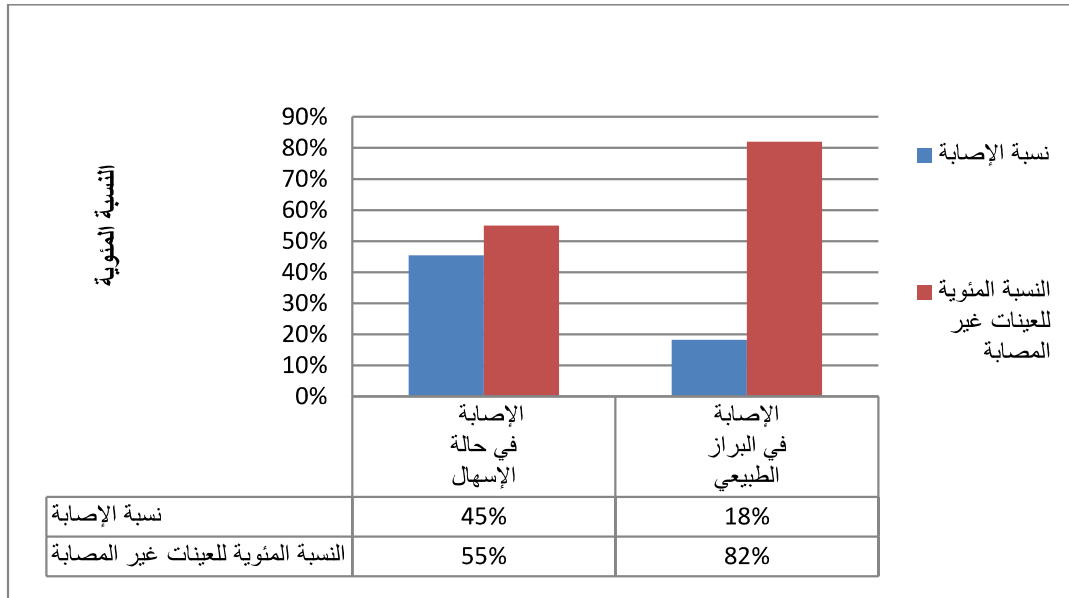


شكل (4-4) مخطط بياني يوضح نسبة الإصابة بداء البويغات الخبيثة في الفئات العمرية المختلفة ومن كلا الجنسين.

كما أظهرت النتائج ارتفاعاً في نسبة الإصابة في عينات الإسهال مقارنة بالعينات ذات البراز الطبيعي حيث كانت نسبة الإصابة في حالة الإسهال (45.45%) أما نسبة الإصابة في البراز الطبيعي فكانت (18.18%) ولم يكن هناك فرقاً معنوياً بين النسبتين , جدول (3-4) وشكل (4-5).

ت	حالة البراز	عدد العينات المصابة	عدد العينات غير المصابة	العدد الكلي	نسبة الإصابة %
1-	طبيعي	8	36	44	18.18%
2-	إسهال	15	18	33	45.45%
	المجموع	23	54	77	31.81%

جدول (3-4) يوضح نسبة الإصابة في عينات البراز الطبيعي والإسهال.

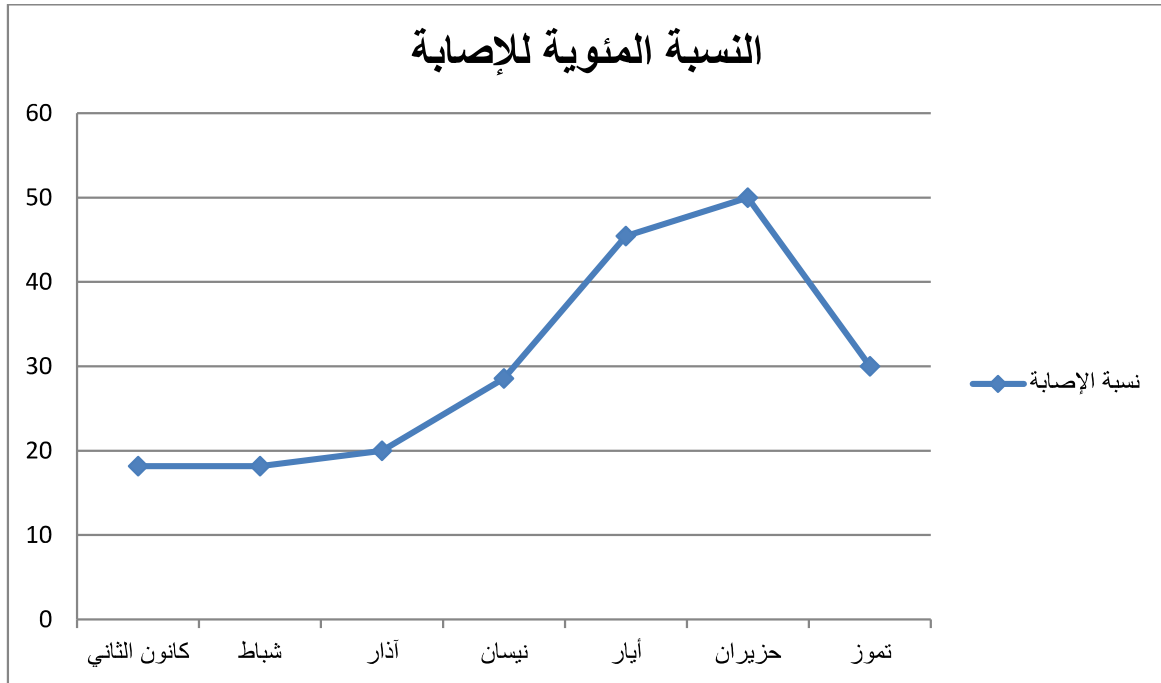


شكل (4-5) مخطط بياني يوضح الفرق بين نسبة الإصابة في حالة الإسهال والإصابة في حالة البراز الطبيعي لكلا الجنسين.

تم تسجيل أعلى نسبة إصابة بداء البويغات الخبيثة بين الأطفال لكلا الجنسين في شهري (أيار و حزيران) وبنسبة إصابة بلغت (45.45% - 50%) على التوالي بينما كانت أقل نسبة إصابة بالطفيلي في شهري كانون الثاني وشباط حيث بلغت نسبة الإصابة (18.18%) لكلا الشهرين ويفارق معنوي ($P < 0.05$) , جدول (4-4) وشكل (4-6).

ت	فترة الدراسة	عدد العينات المصابة	عدد العينات غير المصابة	العدد الكلي	نسبة الإصابة %
-1	كانون الثاني	2	9	11	18.18%
-2	شباط	2	9	11	18.18%
-3	آذار	2	8	10	20%
-4	نيسان	4	10	14	28.57%
-5	أيار	5	6	11	45.45%
-6	حزيران	5	5	10	50%
-7	تموز	3	7	10	30%
المجموع		23	54	77	30%

جدول (4-4) يوضح نسب الإصابة خلال فترة الدراسة .



شكل (4-6) مخطط بياني يوضح نسب الإصابة ببدء البويغات الخبيثة خلال فترة الدراسة.

ويعزى السبب باختلاف نسب الإصابة ببدء البويغات الخبيثة في حالة الاسهال وفي حالة البراز الطبيعي إلى البيئة الجغرافية , والاتصال المباشر ما بين المواطنين وخصوصاً الأطفال مع

الحيوانات المنزلية والمواشي مما يؤدي إلى انتقال العدوى من الحيوان إلى الإنسان , أو ربما يكمن السبب في مصادر المياه المستخدمة من الآبار , فضلاً عن عدم الألتزام بوسائل الوقاية الصحيحة للحد من الإصابة الطفيلي , وكذلك تناول المأكولات والمشروبات من الباعة المتجولين التي تتعدم فيها الشروط الصحية والتي تعد أحد وسائل انتقال الطفيلي إلى الأطفال .

ينتشر طفيلي البويغات الخبيثة *Cryptosporidium sp* والمسبب لداء البويغات الخبيثة Cryptosporidiosis في جميع دول العالم ويصيب جميع الفئات العمرية للإنسان وخاصة الأطفال , وقد أوضحت الدراسات والبحوث التي أجريت لدراسة وبائية هذا الطفيلي حول العالم أن نسب انتشار الطفيلي تختلف من دولة إلى أخرى ومن منطقة إلى أخرى بحسب الاختلاف الجغرافي لتلك الدول حيث كان انتشار الطفيلي بنسبة 1-4% في قارة أوروبا وشمال أمريكا بينما كانت 3-20% في قارات أفريقيا , آسيا , أستراليا وفي جنوب ووسط أمريكا (WHO, 2009).

وقد تم تسجيل حدوث الإصابة بهذا الطفيلي في الدول المجاورة للعراق منها إيران حيث بلغت نسبة الإصابة في 1.7% (Nouri and Toroghi , 1991) , أما في تركيا فقد بلغت نسبة الإصابة 17% بينما كانت الإصابة في الولايات المتحدة الأمريكية (1.1%) (Tanyüksel et al , 1995) .

وكذلك سجلت بعض الدراسات والبحوث التي أجريت على مستوى محافظات العراق حدوث تفاوت بنسب الإصابة بداء البويغات الخبيثة حيث كانت نسبة الإصابة في مدينة الرمادي وضواحيها 39.13% (مخلف , 2008) , وفي محافظة ديالى كانت نسبة الإصابة 2.3% (الطائي , 1997) , أيضاً تم تسجيل حدوث الإصابة بهذا الطفيلي في مدينة الموصل حيث بلغت النسبة 14.3% (الالوسي , 1993) , بينما كانت نسبة الإصابة في شمال بغداد 14.78% (Warid, 2010).

إن ما تم ذكره من قبل (Upton and Current, 1985) و (Lorenzo et al, 1993) في وصف أكياس طفيلي البويغات الخبيثة جاء مشابهاً إلى حد كبير مع ما تم مشاهدته في هذه الدراسة حيث تم مشاهدة الأكياس كروية أو بيضوية الشكل محاطة بهالة شفافة وحاوية بداخلها على أجسام غير واضحة المعالم عند تحريك الضابط الصغير .

إن النسب المئوية لإصابة الإناث والذكور بداء البويغات الخبيثة 30% و 29.72% على التوالي كانت متقاربة جداً بينما نسبة حدوث الإصابة في عينات البراز في حالة الإسهال والبالغة 45.45% كانت أعلى من نسبة الإصابة في حالات البراز الطبيعي والتي كانت 18.18% وتأتي هذه النسب متطابقة مع ما ذكره كل من (Warid, 2010 ; خليل وجماعته, 2011) .

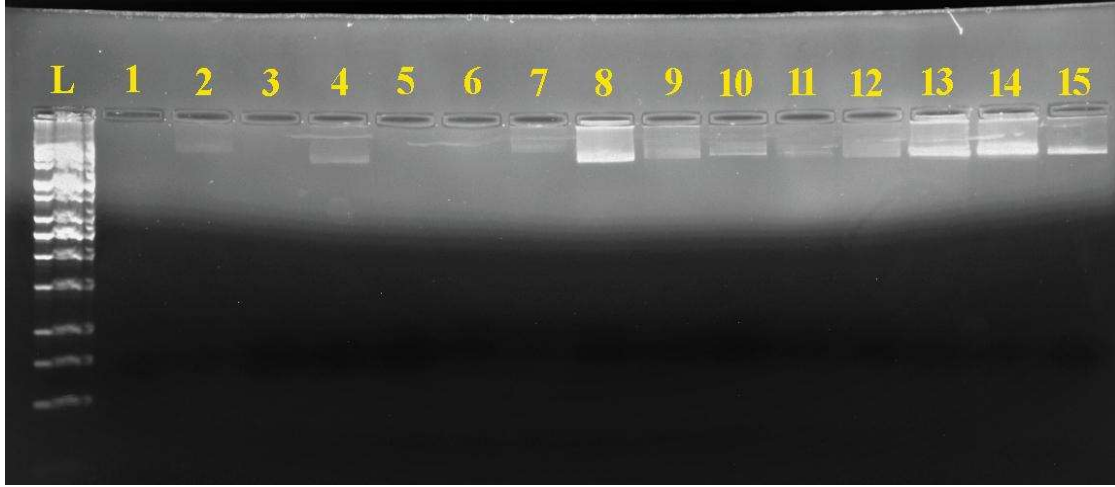
إن اختلاف نسب الإصابة بين الفئات العمرية المستهدفة كان واضحاً فقد لوحظ في هذه الدراسة تناقص في نسب الإصابة بين الأطفال كلما ازداد عمر الطفل حتى انعدم تسجيل أي إصابة للأطفال الذين تزيد أعمارهم عن 7 سنوات وذلك يعزى إلى زيادة فعالية الجهاز المناعي في القضاء على الطفيلي كلما تقدم الفرد بالعمر، وقد جاءت هذه النتائج مشابهة مع ما ذكره كل من (سلمان و محمد، 2013؛ خليل و داود، 2007) وأيضاً متطابقة مع ما نشره (Al-Braiken, 2013) حيث ذكر أن أعلى نسبة إصابة بطفيلي البويغات الخبيثة تكون في الأطفال الذين تقل أعمارهم عن 5 سنوات في المملكة العربية السعودية .

تم في هذه الدراسة تسجيل أعلى نسبة إصابة بطفيلي البويغات الخبيثة بين الأطفال في شهري أيار وحزيران (45.45% - 50%) على التوالي ولم يُلاحظ وجود علاقة بين انتشار الإصابة بالطفيلي وبين ارتفاع أو انخفاض درجات الحرارة خلال فصول السنة، و جاءت هذه النتائج مشابهة لما ذكره (Warid, 2010) حيث سجّل أعلى نسبة إصابة بالطفيلي في شهري أيار و تموز في شمال بغداد وبلغت 25.7% - 19.35% على التوالي، بينما ذكر (السامرائي، 2006) بأن أعلى نسبة إصابة بالطفيلي في مدينة سامراء كانت في أشهر الربيع نيسان و آذار . و كذلك أشار (عواد و ناصر، 2014) إلا أن أعلى نسبة انتشار لأكياس الطفيلي في بعض مصادر المياه في محافظة البصرة كانت خلال شهري شباط ونيسان، وعلى العكس مما ذكره (علي و علي، 2007) حيث سجّل أعلى نسبة إصابة بأكياس الطفيلي بين الأطفال في ناحية تازة في كركوك كانت في شهر أيلول حيث بلغت (71.4%) .

يعود الاختلاف في النتائج بين الدراسات المختلفة والتي بحثت في وبائية طفيلي البويغات الخبيثة إلى عدة أسباب منها : الاختلاف في عدد العينات المفحوصة في كل دراسة، اختلاف المناطق الجغرافية التي أجريت فيها الدراسات والبحوث سواءً كانت مناطق حضرية أم ريفية، مستوى الخدمات الصحية المقدمة وكفاءة أنظمة الصرف الصحي، المستوى التعليمي لسكان تلك المناطق وكثافة السكان وكذلك إلى مدى تداخل تربية الحيوانات مع أفراد الأسرة في مكان واحد . قد يكون للأوضاع الأمنية المتدهورة والتي شهدها البلد في عام 2014 دوراً في حدوث الإصابة بالطفيلي حيث أدت إلى حدوث حركات نزوح بين السكان من منطقة إلى أخرى زادت من تداخل السكان بمختلف فئاتهم وبالتالي أدى إلى تدني الحالة الاقتصادية للبلد بشكل عام ومنطقة الدراسة بشكل خاص مما أثر سلباً على المخصصات المالية لقطاعي البلدية والصحة والذي نتج عنه حدوث الإصابة بداء البويغات الخبيثة بين الأشخاص عموماً والأطفال على وجه الخصوص .

1.4) استخلاص الحمض النووي من عينات البراز DNA extraction from stool samples

أظهرت النتائج أن تراكيز عينات DNA المُستخلصة من عينات البراز من المجموعة الأولى والبالغ عددها 28 عينة كانت واطئة جداً مقارنة بتراكيز عينات DNA المُستخلصة من عينات البراز من المجموعة الثانية والبالغ عددها 22 عينة ويمكن أن يُعزى ذلك إلى فقدان أعداد كبيرة من أكياس بيض الطفيلي في أثناء عملية غسل العينة والتي قد تم ذكرها في الفصل السابق للتخلص من بقايا محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم وخصوصاً إذا كانت العينة حاوية على أعداد قليلة من هذه الأكياس حيث أن تكرار عملية الغسل يزيد من إمكانية فقدان هذه الأكياس وذلك من شأنه تقليل كمية الحمض النووي المُستخلص من العينة وبالتالي التأثير على نتائج تطبيق تقنية PCR (Lalonde and Gajadhar, 2009) , حيث أن تراكيز الأحماض النووية المُستخلصة من هذه العينات (لكلا المجموعتين) كانت قليلة جداً وذات نقاوة واطئة جداً بعد قياس تركيزها ونقاوتها بجهاز Nanodrop ولم تُظهر هذه العينات أي حُزم في الآكاروز بتركيز 2% .



شكل (4-7) الترحيل الكهربائي للحمض النووي المُستخلص من عينات البراز تبعاً لمجموعة التحويرات الثانية على طريقة عمل الشركة المُجهزة للـ kit في هلام بتركيز 2% مُضاف إليه صبغة ethidium bromide حيث ظهرت حزم الأحماض النووية لبعض العينات المُستخلصة منها:

L = الحمض النووي الواسم DNA Ladder .

15-1 = أرقام العينات التي تم استخلاص الحمض النووي منها .

بالرغم من وجود دراسات عديدة على طفيلي البويغات الخبيثة التي تناولت استخلاص الحمض النووي من أكياس بيض الطفيلي إلا إن معظم طرق الاستخلاص لم يتم التطرق إليها بشكل كامل (Gonçalves *et al.*, 2008 ; OIE, 2008) .

بالإضافة إلى ذلك فقد قام العديد من الباحثين باستخدام طرق أخرى في استخلاص الحمض النووي للطفيليات والبكتيريا من عينات البراز وغيرها من العينات , حيث قام (Orlandi and Lampel, 2000) باستخدام طريقة FTA filter paper كطريقة سريعة لاستخلاص الحمض النووي من *Cyclospora sp* , *Cryptosporidium parvum* و *microsporidi* لاستخدامه في تقنية PCR بينما استخدم (Lampel et al, 2000) طريقة FTA paper لاستخلاص الحمض النووي من بكتريا (*Shigella* , *Salmonella* و *Listeria sp*) , وقد قام (Carnevale, 2000) باستخدام طريقة Whatman filter paper للحصول على الحمض النووي من عينات البراز الحاوية على *microsporidian Enterocytozoon bienensei* .

وإستخدام (Hallier-Soulier and Guillot, 2000) مادة Chelex الصمغية كنوع آخر من الطرق السريعة لتحضير الحمض النووي من أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة من أجل استخدامها في تقنية PCR . بينما أُعتبرت طريقة استخدام Xtra Bind matrix كأحدث طريقة سريعة لاستخلاص الحمض النووي والتي استخدمها (Kozwich et al, 2000) في الكشف عن *C.parvum* RNA باستخدام فحص reverse transcriptase PCR .

أما (Higgins et al, 2001) فقد قام باستخدام طرق Xtra Amp tube, Isocode paper, Instagene matrix و PrepMan matrix لاستخلاص الحمض النووي بصورة سريعة من بكتريا *E. coli* O157:H7 ومن أكياس بيض طفيلي *C.parvum* لاستخدامها في تقنية PCR .

ومن الممكن أيضاً استخلاص الحمض النووي من أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة إما بعد تنقيتها بشكل جزئي وذلك يكون من خلال استخدام طرق التطويق flotation , الترسيب sedimentation أو بتقنيات IMS أو يُستخلص من أكياس البيض في البراز باستخدام حبات zirconia (McLauchlin et al., 1999) . بالإضافة إلى ذلك فإنه بالإمكان استخدام عدة دورات من التجميد والذوبان freez-thaw بواسطة النتروجين السائل على العينات الحاوية على أكياس بيض الطفيلي من أجل استخلاص الحمض النووي منها إلا أنها تعد من الطرق التي تتضمن مشاكل خصوصاً عند التعامل مع أعداد كبيرة من العينات المراد فحصها ومن مساوئ هذه الطريقة هي صعوبة التعامل معها وتعد من الطرق غير الآمنة كما أوضح ذلك (Sharbatkhori et al, 2009 ; warid, 2010) .

ومن خلال ما أظهرته النتائج فإن فقدان أعداد من أكياس بيض الطفيلي في أثناء عملية غسل العينة المحفوظة في محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم للتخلص من آثار المحلول ليست السبب الوحيد للحصول على تراكيز واطئة من الأحماض النووية المُستخلصة من عينات البراز بل إلى جانب ذلك فإن عدم انتشار هذه الأكياس بشكل متجانس في عينة البراز يؤدي إلى الحصول على تركيز قليل من الحمض النووي سواءً كان مُستخلصاً من عينات البراز المحفوظة بمحلول ثنائي كرومات البوتاسيوم أو من العينات المحفوظة فقط بدرجة حرارة 4°م كما ذكره (Gonçaves et al., 2008).

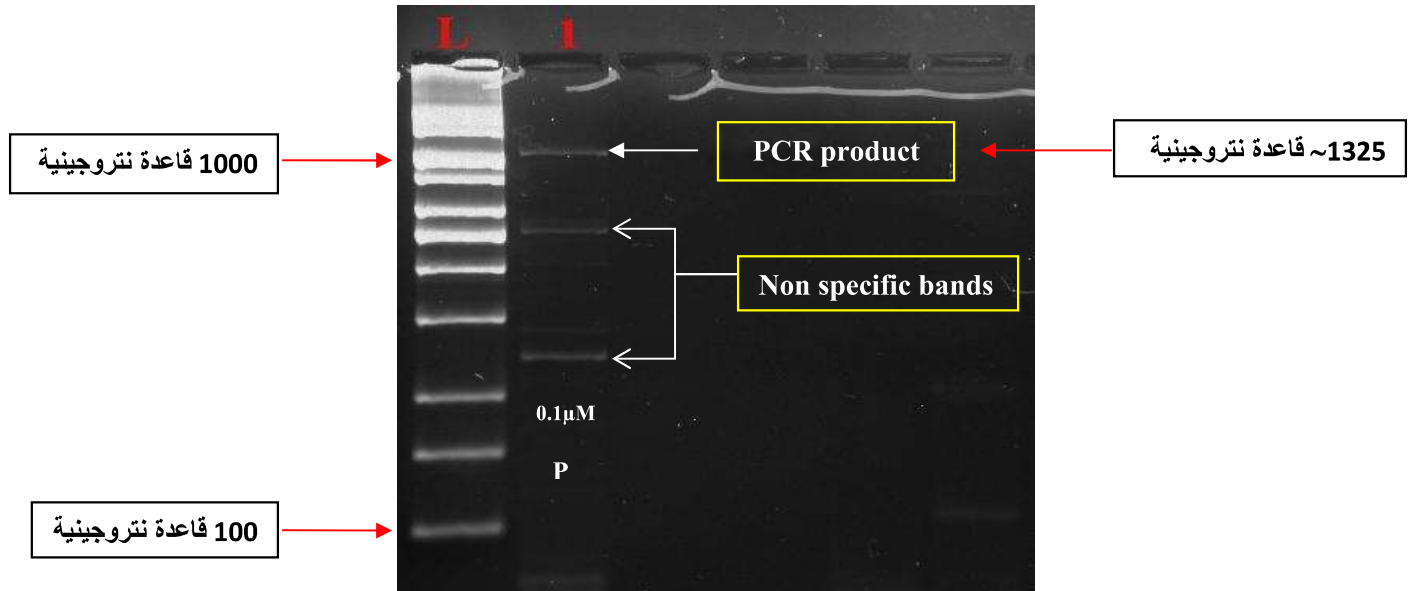
إن صعوبة زراعة طفيلي البويغات الخبيثة خارج جسم الكائن الحي للحصول على أعداد كبيرة من أكياس بيض الطفيلي لاستخلاص الحمض النووي منها حال دون القيام بهذه العملية , حيث تتطلب هذه العملية جهداً كبيراً وتكلفة عالية واستهلاكاً للوقت وأيضاً تكون محددة باحتمالية عدم حدوث الإصابة للخلايا المزروعة من بعض عزلات طفيلي *C.parvum* حيث تكون نسبة حدوث الإصابة أقل بكثير من نسبة حدوثها داخل جسم الكائن الحي (Morgan andThompson ,1998b).

2.4 ملاءمة ظروف تفاعل PCR وتحليل تسلسل الحمض النووي :Optimization of PCR conditions and DNA sequencing analysis

من أجل تطبيق فحص PCR على عينات DNA المُستخلصة من عينات البراز كان لابد من تهيئة ظروف تفاعل PCR المناسبة لإتمام هذا الفحص بشكل صحيح وجيد , حيث تشمل هذه الظروف ما يأتي:

- نوع الخليط الرئيسي Mastermix , وهو خليط يتضمن كل المكونات اللازمة لإتمام تفاعل PCR من Taq DNA polymerase وأيونات وقواعد نيتروجينية وغيرها من المواد الضرورية للتفاعل باستثناء عينة DNA لاختصار الوقت اللازم لخلط هذه المواد فيما لو كانت منفصلة , حيث أن هناك عدة شركات لتصنيع هذا الخليط.
- درجات حرارة المسخ والالتحام Denaturation and annealing temperatures.
- عدد دورات تفاعل PCR.
- أحجام وتراكيز البودائ Primers المستخدمة في التفاعل.
- حجم عينة الحمض النووي.
- حجم ماء من نوع DNase, RNase-free water.

وقد أظهرت نتائج تطبيق فحص PCR أنه عند استخدام الخليط المُجهز من شركتي (Solis BioDyne و analytikjena) كل على حدى مع استخدام البودائى Primers بتركيزين لكل فحص ($0.1 - 0.2 \mu\text{M}$) وتحديد درجة حرارة إلتحام البودائى Annealing temperature بقطعة قالب DNA بدرجتين ($50^\circ\text{M} - 55^\circ\text{M}$) على التوالي وبواقع (30 دورة و 45 دورة) لكل Master mix بالإضافة إلى عينة DNA والماء المقطر وبالأحجام التي سبق وتم ذكرها في الفصل الثالث لإجراء الفحص لعينات الحمض النووي لطيفلي البويغات الخبيثة المراد تضخيم جزء منه لم يحدث التفاعل ولم يُظهر ناتج PCR (PCR product) أي حزم عند تحميله في الآكاروز وبتركيز 2% والمصبوغ بصبغة ethidium bromide , بينما عند استخدام الخليط الرئيسي Master mix المُجهز من شركة (GeNet Bio) ولكل من تراكيز البودائى أعلاه مع تعديل بعض ظروف تفاعل PCR من ضمنها عدد الدورات وبواقع (45 دورة فقط) مع تغيير درجة حرارة التحام البودائى Annealing temperature إلى درجة 60°M وكذلك تخفيف عينة الحمض النووي المُستخدمة في التفاعل من خلال استخدام $5 \mu\text{l}$ من الماء المقطر أظهرت ناتج PCR لعينات الحمض النووي المُستخدمة حُزم عند تحميلها في الآكاروز وبتركيز 2% والمصبوغ بصبغة ethidium bromide مما يدل على حدوث عملية التضخيم كما في شكل (4-8 , 4-9) .

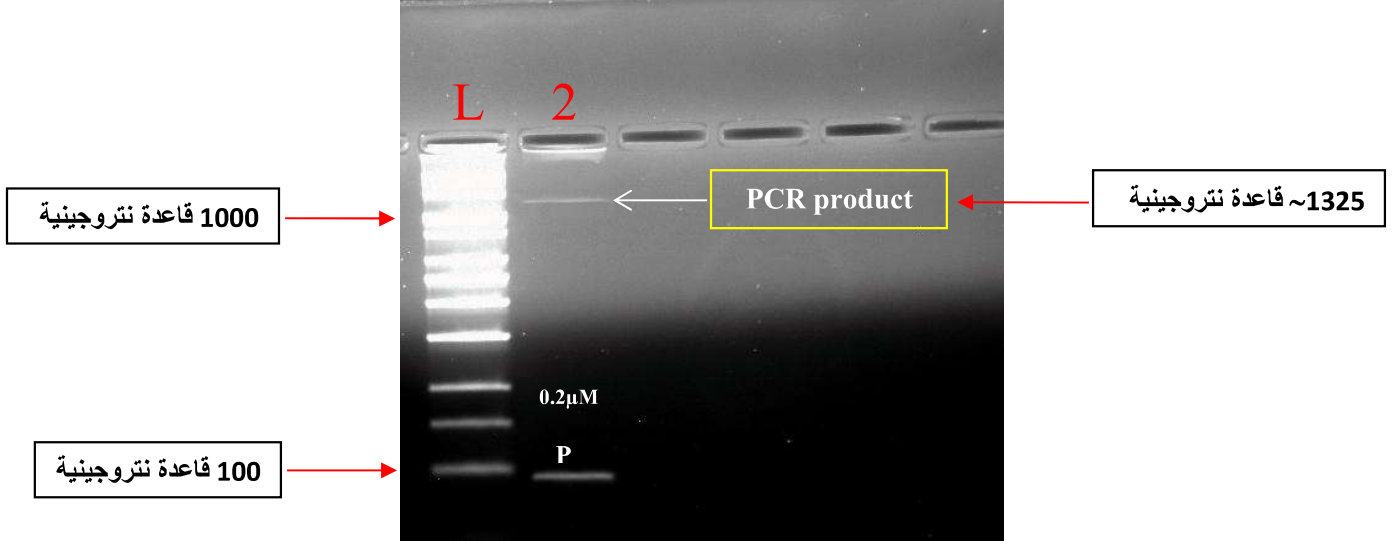


شكل (4-8) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR باستخدام Master mix من شركة (GeNet Bio) للعينة رقم 1 في هلام الآكاروز بتركيز 2% مضاف إليه صبغة ethidium bromide :

Non specific bands = حُزم غير مُتخصصة.

PCR product = نواتج تفاعل PCR (الحمض النووي لطفيلى البويغات الخبيثة) مايقارب 1325 bp,

P = استخدام البودائ primers بتركيز 0.1 μ M.



شكل (4-9) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR باستخدام Master mix من شركة (GeNet Bio) للعينة رقم 2 في هلام الآكاروز بتركيز 2% مضاف إليه صبغة ethidium bromide :
Non specific bands = حُزم غير مُتخصصة.
PCR product = نواتج تفاعل PCR (الحمض النووي لطفيلى البويغات الخبيثة) مايقارب 1325 bp,
P = استخدام البودائ primers بتركيز 0.2 μ M.

أظهرت نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لثلاث عينات من نواتج تفاعل البلمرة والتي تم إرسالها لقراءة تسلسل القواعد النتروجينية الخاصة بها والنتيجة عن استخدام بودائ تُنتج Amplicon يُقارب طوله 1325 قاعدة نتروجينية عدم مطابقة تسلسل القواعد النتروجينية للعينات مع تسلسل القواعد النتروجينية للحمض النووي الرئيسي الخاص بطفيلى البويغات الخبيثة *Cryptosporidium* reference gene شكل (4-10) , حيث أظهرت قراءة تسلسل القواعد النتروجينية للعينة الأولى سلسلة بطول 575 قاعدة نتروجينية لنواتج البادئ SSU-F1 وسلسلة بطول 572 قاعدة نتروجينية لنواتج البادئ SSU-R1 , وكانت قراءة تسلسل القواعد النتروجينية للعينة الثانية سلسلة بطول 1240 قاعدة نتروجينية لنواتج البادئ SSU-F2 وسلسلة بطول 889 قاعدة نتروجينية لنواتج البادئ SSU-R2 بينما كانت قراءة تسلسل القواعد النتروجينية للعينة الثالثة سلسلة بطول 510 قاعدة نتروجينية لنواتج البادئ SSU-F3 وسلسلة بطول 534 قاعدة نتروجينية لنواتج البادئ SSU-R3 .

ومما سبق يُمكن ملاحظة أن أفضل تركيز للبوادئ هو $0.1 \mu\text{M}$ يُمكن استخدامه مع نوعية الخليط الرئيسي Master mix (من شركة GeNet Bio) وظروف التفاعل المحددة أعلاه للحصول على Amplicon $\sim 1325 \text{ bp}$.

يعد استخدام التقنيات الجزيئية ومن ضمنها تقنية PCR بكافة أنواعها من أفضل التقنيات للكشف عن الإصابة بأكياس بيض طفيلي البويضات الخبيثة والمُسببة لالتهابات الجهاز الهضمي خصوصاً عند الأطفال لدقتها العالية في الكشف عن الحمض النووي للطفيلي في العينات المفحوصة حتى وإن كانت أعداد الأكياس قليلة جداً . حيث ذكر (Sulaiman *et al.*, 1998) أن تقنية PCR أثبتت قدرتها على أن تكون محددة وحساسة جداً في الكشف عن أكياس الطفيلي . وقد اكتسبت تقنية PCR أهمية متزايدة في المختبرات التشخيصية لتشخيص الإصابات البكتيرية والفايروسية (Eberhard, 2007 ; Mackay, 2004,2002).

إن ظهور نتائج سلبية في بادئ الأمر (أي قبل إجراء التعديلات على ظروف التفاعل) ممكن أن يُعزى سببه إلى قلة تراكيز عينة الحمض النووي المُستهدفة أو وجود شوائب ومثبطات تؤثر على فعالية أنزيم Taq polymerase المستخدم في تفاعل PCR مما يُعطي نتيجة سلبية للعينة التي كانت موجبة في المسحات المصبّغة بصبغة الزيل نلسن لذلك تم تخفيف عينة الحمض النووي المُستخدمة في التفاعل للتخفيف من التأثير المحتمل للمواد المثبطة على الأنزيم, وكذلك من الممكن أن تؤثر هذه الشوائب والمثبطات على فعالية الخليط الرئيسي Master mix لذلك بالامكان زيادة حجم الخليط الرئيسي (Dietrich , 1995 ; Roux, 2014 ; Hawash, 2014 ; James *et al.*, 2001 ; Spibida *et al.*, 2016 ; *et al.*, 2013) , وأيضاً نكر (Xiao *et al.*, 2001b) أن المثبطات لها تأثير كبير على فعالية فحص PCR في الكشف عن طفيلي البويضات الخبيثة في عينات الماء حيث اختزلت هذه المثبطات حساسية تقنية PCR في الكشف عن أكياس بيض الطفيلي .

وأيضاً في هذه الدراسة تم ملاحظة ظهور حزم خفيفة وباهتة عند تحميل ناتج PCR في الآكاروز كما في شكل (4-9) عند استخدام بوادئ بتركيز $0.2 \mu\text{M}$ مقارنة بالحزم في حالة استخدام بوادئ بتركيز $0.1 \mu\text{M}$, وذلك يُعزى إلى وجود المثبطات أو إلى قلة تركيز ونقاوة عينة الحمض النووي المستخدم كما ذكره (الخفاجي, 2013) . أو قد تكون البوادئ نفسها ملوثة مما يؤدي إلى ظهور مثل هذه الحزم الخفيفة (<http://www.bio-rad.com>) .

وفي بعض العينات وبعد عملية التضخيم في جهاز PCR وتحميل الناتج في الآكاروز تم مشاهدة حزم غير متخصصة Non specific bands للحمض النووي حيث تُشير أوزانها الجزيئية

إلى أنها حزم عشوائية وغير مرغوب بها كما في شكل (4-8) ، حيث ترتبط البوادي بمواقع غير متخصصة على قالب الحمض النووي المستخدم في التفاعل أو ترتبط مع بعضها البعض ، ويُعزى ذلك إلى أن بعض الأنزيمات تُبدي فعالية قليلة في درجة حرارة الغرفة أو في درجة حرارة 4°م (; Primrose and Twyman, 2013 <http://www.bio-rad.com>).

إن الكشف عن موضع نسخة واحدة من الحمض النووي قد لا يمتلك الحساسية الكافية للكشف عن الأعداد القليلة لأكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة والتي كثيراً ما وُجدت في العينات السريرية أو في العينات البيئية (Smith and Nichols, 2010) .

ليس فقط التركيز القليل لأكياس بيض الطفيلي يلعب دوراً في عدم الكشف ومضاعفة قطعة الحمض النووي المستهدفة للطفيلي بل هناك عدة مُعرقلات تؤثر على تشخيص الأولي المعوية التي تُصيب الإنسان ومن ضمنها طفيلي البويغات الخبيثة بواسطة تقنية PCR ومن هذه الأسباب :

- إن المادة الوراثية لهذا الطفيلي تكون محصورة بشكل رئيسي بأكياس البيض وهي تمتاز بامتلاكها جدران سميكة مما يُصعب من عملية استخلاص الحمض النووي ، وكذلك عدم كفاية عملية حفظ العينات أو تحلل عينة الحمض النووي خلال الخزن يؤثر على تطبيق تقنية PCR (Gonçalves *et al.*, 2008 ; Surl *et al.*, 2011) .

- عينة البراز والتي تعد المرحلة التشخيصية لهذا الطفيلي وهي تعد عينة مُعقدة جداً . حيث أن عينات البراز الصلبة ليس من السهولة تطبيقها في تقنية PCR ولذلك لا يُمكن توقع حساسية هذه التقنية مع عينات البراز الصلبة ، حيث تحتوي عينة البراز على عدة مكونات مثل : الهيموغلوبين ، البيليروبين ، أملاح الصفراء والكاربوهيدرات وهذه المواد تعد مُثبطات لفحص PCR وبذلك تُضعف هذه المكونات عملية تحلل أكياس بيض الطفيلي وتحلل الحمض النووي وتُثبط فعالية أنزيم polymerase المُستخدم في تحديد الحمض النووي للطفيلي . حيث أن إمكانية تلوث عينة الحمض النووي بهذه المثبطات أو بالملوثات الأخرى تؤثر على نتائج تقنية PCR (Stephen and Cummings, 1980 ; Gobet *et al.*,) (soud and Rådström, 2001 ; Watson and Blackwell, 2000 ; OIE, 2008 ; Al-1997 ; Oikarinen *et al.*, 2009 ; Schrader *et al.*, 2012 ;

- قوالب الحمض النووي الغنية بقواعد GC النتروجينية والتي تؤثر على فعالية أنزيم DNA polymerase وأيضاً على عملية التضخيم في تقنية PCR ، حيث كلما كانت هذه القوالب طويلة وغنية بهذه القواعد كلما زادت من صعوبة عملية التضخيم أو حتى فشلها ولذلك فإنها تعد من الأهداف الصعبة في تطبيق تقنية PCR. وكذلك تعد القوالب الطويلة المُستخدمة

كهدف مُراد تضخيمه في تفاعل البلمرة من العوامل المؤثرة على التفاعل وعلى دقة عملية قراءة تسلسل القواعد النتروجينية للحمض النووي الناتج بعد عملية التضخيم مما يؤدي إلى إعطاء نتائج وقراءات خاطئة (; Mamedov *et al.*, 2008 ; Hubscher *et al.*, 2010 ; *Spibida et al.*, 2016).

ومما سبق ذكره فإن تلوث عيّنات الحمض النووي المُستخلصة من عيّنات البراز بالمشروبات والشوائب وكذلك قلة تركيز الحمض النووي للطفيلي والناتج من ضعف عملية الاستخلاص والتي يعود سببها بشكل رئيس إلى نوع العيّنات نفسها المُستخدمة في الدراسة (عيّنات البراز) والتي تعد عيّنات معقدة جداً كما ذكرنا سابقاً , وجميعها تعد عوامل أثرت على نتيجة قراءة تسلسل القواعد النتروجينية للحمض النووي للعيّنة مما أدى إلى إظهار نتيجة سالبة للقراءة مُقارنة بتسلسل القواعد النتروجينية للحمض النووي الرئيسي للطفيلي , بالإضافة إلى ذلك فإن استخدام بوادي تُنتج Amplicon يكون طوله ما يُقارب 1325 قاعدة نتروجينية حيث أن هكذا نواتج يكون من الصعوبة قراءة تسلسل القواعد النتروجينية لها مما يؤدي إلى إعطاء نتائج سلبية للقراءة خصوصاً عندما يكون الكائن الحي المُستهدف في مثل هكذا دراسات هو طفيلي البويغات الخبيثة الذي يمتاز بمقاومته الكبيرة للظروف المُحيطة به وأيضاً في حال كانت أعداد أكياس بيض الطفيلي قليلة وعدم انتشارها بشكل متجانس في عيّنات البراز ولذلك لا يُمكن الاعتماد فقط على تطبيق تفاعل البلمرة التقليدي للحصول على هكذا نواتج بل يتم تطبيق تقنية Nested PCR لتضخيم جزء أصغر من هذه النواتج لغرض قراءة تسلسل القواعد النتروجينية لها ومقارنتها بالتسلسل الرئيسي للطفيلي (; Higgins *et al.*, 2001 ; Valenzuela, *et al.*, 2014 ; Siddiki *et al.*, 2015 ; Gallas-Lindemann *et al.*, 2016).

إن الكلفة المادية المرتفعة لإجراء فحص PCR للعيّنة الواحدة حالت دون تكرار هذا الفحص للعيّنة أكثر من مرة مع جميع أنواع الخليط الرئيسي Master mix المُستخدمة في الدراسة وبظروف التفاعل التي تم تغييرها عدة مرات وأيضاً كانت مانعاً لتطبيق تقنيات أخرى للكشف عن الطفيلي , لذا اقتصر تطبيق وتكرار الفحص تحت ظروف التفاعل المختلفة مع أنواع مختلفة من الخليط الرئيسي على عدد محدد من العيّنات وعلى نوع واحد من تقنية PCR وهذه كانت إحدى أهم الأسباب المُحددة لعدم التوسع في بحثنا.

Primers:

For primary PCR

F1 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'

R1 5'-CCCATTTCTTCGAAACAGGA-3' 1307bp

TTCTAGAGCTAATACATGCGAAAAAACTCGACTTTATGGAAGGGTTGTAT
 TTATTAGATAAAGAACCAATATAATTGGTGACTCATAATAACTTTACGGA
 TCACATTAATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGAC
 GGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGG
 GTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAA
 GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACA
 AGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGT
 ATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGC
 CGCTGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAA
 AAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTAAATAATTTATATAAAATATTTTGATGA
 ATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATA

AATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATCTTGAATA
 CTCCAGCATGGAATAATATTAAGATTTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAA
 GATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACG
 TCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAATGCGAAACGAT
 TTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG
 ACGATCAGATAACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGAT
 TGGAGGTTGTTCCTTACTCCTTCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTT
 GGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGAC
 GGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACAC
 GGGAAAACCTACCAGGTCCAGACATAGGAAGGATTGACAGATTGATAGC
 TCTTTCTTGATTCTATGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAG
 TGATTTGTCTGGTTAATTCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAAT
 AGACATAAGAAATATTATATTTTTTATCTGTCTTCTTAGAGGGACTTGTA
 TGTTTAATACAGGAAGTTTAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGAT
 GTCCTGGGCGCGCGCGCTACACTGATGCATCCATCAAGTATATATTCCT
 GTTTCGAAGGAAATGGG

شكل (4-10) يُبين تسلسل القواعد النتروجينية في الحمض النووي الرئيسي لطفيلي البويغات الخبيثة
Cryptosporidium Reference gene باستخدام زوج من البوائء المُشار لها باللون الأصفر المتوهج والذي
 يُنتج Amplicon يُقارب طوله 1325 قاعدة نتروجينية.

من أهم إستنتاجات هذه الدراسة:

- (1) البيئة الجغرافية لسكان منطقة الدراسة وضعف الوعي الصحي للمواطنين وانتشار تربية الحيوانات المنزلية والمواشي في البيوت أو مناطق قريبة منها وكذلك قلة التخصيصات المالية للقطاع الصحي والبلدي أدى إلى ظهور حالات الإصابة بداء البويغات الخبيثة.
 - (2) لم يؤثر استخدام صبغتي الملاكايت الخضراء والميثيلين الزرقاء كصبغات تفريقية في تحضير المسحات المصبوغة بصبغة الزيل نلسن المحورة على قراءة المسحة تحت المجهر الضوئي للكشف عن أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيثة.
 - (3) تكمن صعوبة استخلاص الحمض النووي من أكياس بيض الطفيلي في عينات البراز على احتوائها على الكثير من الشوائب والفضلات والتي تُعد من المواد المثبطة لعملية تفاعل البلمرة التقليدي , وكذلك تأثيرها على تركيز ونقاوة عينة الحمض النووي المُستخلصة.
 - (4) إن إجراء عملية استخلاص الحمض النووي من أكياس بيض الطفيلي في عينة البراز بصورة مُباشرة دون حفظها بمادة ثنائي كرومات البوتاسيوم تكون أفضل للحصول على حمض نووي جيد النقاوة والتركيز لتجنب عملية غسل العينة والتي من الممكن أن تؤدي إلى فقدان العديد من الأكياس في أثناء الغسل.
- ليس من السهل تطبيق تقنية تفاعل البلمرة التقليدي لوحدها للكشف عن أكياس بيض الطفيلي باستخدام بواقي تُنتج Amplicon بطول 1325 قاعدة نتروجينية تقريباً لأنه من الصعب الوصول إلى الظروف المثلى لحدوث التفاعل وكذلك صعوبة قراءة تسلسل القواعد النتروجينية له.

الالوسي, توفيق إبراهيم. (1993). حدوث داء الكريبتوسبورديم في الاطفال والعجول في الموصل . رسالة ماجستير -كلية الطب البيطري - جامعة الموصل .

الجرجري, سينا عبد الله. (2006). محاولات في علاج داء البويغيات الخبيثة في الفئران البيض سلالة BALB/c. أطروحة دكتوراة, كلية العلوم, جامعة الموصل, الموصل, العراق.

الخفاجي, زهرة محمود و أبو المعالي, حسن محمود. (2013). تفاعلات الكثرة وتصميم البوادي PCRing and primer design. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي , جامعة بغداد, معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الحيوية للدراسات العليا, رقم الإيداع في دار الكتب والوثائق ببغداد 560, 22-23.

السامرائي, أميمة إبراهيم محمود. (2006). دور المياه في انتشار طفيلي البويغيات الخبيثة *Cryptosporidium parvum* في مدينة سامراء . مجلة تكريت للعلوم الصرفة , المجلد 11 , العدد 1 .

الطائي, مجيد حمود. (1997). دراسة في وبائية داء الابواغ الخبيثة في محافظة ديالى . رسالة ماجستير , كلية الطب البيطري, جامعة بغداد, بغداد, العراق.

العبيدي, وسن امجد احمد. (2006) الكشف عن طفيلي الأبواغ الخبيثة *Cryptosporidium* sp في حدائق حيوانات مدينتي الموصل ودهوك, المجلة العراقية للعلوم البيطرية, المجلد 20, العدد 2, 203-212 .

خليل, ليان ياسين و داؤد, محسن سعدون. (2007). دور التقنيات المختبرية في تشخيص داء الابواغ الخبيثة في الأطفال في محافظة نينوى , مجلة علوم الرافدين , المجلد 18 , العدد 12, 39-4 .

خليل, منى موسى و الزبيدي, محمد ثابت صالح و كاظم, فوزية شعبان. (2011). دراسة في وبائية طفيلي الأبواغ الخبيثة ومقارنة كفاءة طريقة الاليزا مع بعض الطرائق التقليدية في تشخيص الاصابة في العجول , المجلة الطبية البيطرية العراقية 35 (2) : 145-155.

سلمان, علي نعيم و محمد ,شذى جواد. (2013). دراسة عن وبائية داء الأبواغ الخبيثة Cryptosporidiosis في أطفال محافظة ذي قار , مجلة كلية التربية للعلوم الصرفة, المجلد 3 , العدد 1, 31-16 .

علي, عبير عباس و علي , شهد عباس. (2007). دراسة عن وبائية داء البويغيات الخبيثة Cryptosporidiosis في بعض مناطق كركوك , مجلة التقني , المجلد: 20 الاصدار 1: A19-A24 .

عواد, عبد الحسين حبش و ناصر ,سارة كامل. (2014). دراسة انتشار أكياس طفيلي الأبواغ الخبيثة *Cryptosporidium* sp في بعض مصادر مياه محافظة البصرة , مجلة علوم ذي قار , المجلد 4 (3) , 12-9 .

مخلف, مهند محمد. (2008). دراسة انتشار طفيل *Cryptosporidium parvum* في الاطفال دون السن الخامسة من العمر في مدينة الرمادي وضواحيها , مجلة جامعة الأنبار للعلوم الصرفة , المجلد 2, العدد 2 .

(A)

- Abougrain, A. K., Nahaisi, M. H., Madi, N. S., Saied, M. M., and Ghenghesh, K. S. (2010). Parasitological contamination in salad vegetables in Tripoli-Libya. *Food control*, 21(5), 760-762.
- Abrahamsen, M. S., Templeton, T. J., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Zhu, G., Lancto, C. A., ... and Buck, G. A. (2004). Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, 304(5669), 441-445.
- Al-Braiken, F.A., Amin, A., Beeching, N. J., Hommel, H. and Hart, C. A. (2013). Detection of *Cryptosporidium* amongst diarrhoeic and Asymptomatic children in Jeddah, Saudi Arabia. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 97: 505-10.
- Al-Dulaimi, F. H., and Mughier, A. H. (2013). Prevalence Of *Cryptosporidium* Sp. And Treatment By Using Some Plants Extracts In Al-Hilla City\Babylon Province. *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences*, 4(21), 1211-1220.
- AL-Gelany, B.A. (1998). The Epidemiology of Cryptosporidiosis in Baghdad (Doctoral dissertation, M. Sc. thesis, University of Baghdad. 64 pp).
- AL-Gelany, B.A., (2003). An Epidemiological and Diagnostic Study of *Cryptosporidium* in the Man and Animal in AL-Thahab AL-Abiydh Village (Doctoral dissertation, Ph. D thesis, University of Baghdad. pp: 192).
- Al-Soud, W. A., and Rådström, P. (2001). Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *Journal of clinical microbiology*, 39(2), 485-493.
- Amoro's, I., Alonso, J.L. and Cuesta, G. (2010). *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. *Journal of Food Protection*®, 73(6), 1138-1140.
-



- Angus, K. W., Sherwood, D., Hutchison, G., & Campbell, I. (1982). Evaluation of the effect of two aldehyde-based disinfectants on the infectivity of faecal cryptosporidia for mice [protozoan parasites]. *Research in veterinary science*. 33:379-381.
- Anonymous., (1982). Cryptosporidiosis, assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 31, 89–102.
- Araki, S., Martin-Gomez, S., Becares, E., Luis-Calabuig, E. and Rojo-Vasquez, F. (2001). Effect of high-rate algal ponds on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 3322-3324.
- Arcay, L., Baez de Borges, E. and Bruzual, E. (1995). Cryptosporidiosis experimental en la escala de vertebrados. I. Infecciones experimentales, II. Estudio histopatológico. *Parasitol. día* 19, 20–29.
- Asahi, H., Koyama, T., Arai, H., Funakoshi, Y., Yamaura, H., Sirasaka, R. and Okutoni, K. (1991). Biological nature of *Cryptosporidium* sp. isolated from a cat. *Parasitology research*, 77(3), 237-240.
- Atwill, E.R., Hou, L., Karle, B.M., Harter, T., Tate, K.W. and Dahlgren, R.A. (2002). Transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts through vegetated buffer strips and estimated filtration efficiency. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5517-5527.

(B)

- Bankier, A. T., Spriggs, H. F., Fartmann, B., Konfortov, B. A., Madera, M., Vogel, C., ... and Dear, P. H. (2003). Integrated mapping, chromosomal sequencing and sequence analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Genome research*, 13(8), 1787-1799.
- Baxby, D., Getty, D., Blundell, N., and Ratcliffe, S. (1984). Recognition of whole *Cryptosporidium* oocysts in feces by negative staining
-



and electron microscopy. *Journal of clinical microbiology*, 19 (4) : 566 – 567.

Beach, M. J.(2008). Waterborne: Recreational Water in: Fayer, R. and Xiao,L.editors."Cryptosporidium and Cryptosporidiosis" 2ed edition. *Taylor & Francis Group.*, USA.:355-361 pp.

Betancourt, W.Q. and Rose, J.B. (2005). Microbiological assessment of ambient waters and proposed water sources for restoration of a Florida wetland. *Journal of water and health*, 3(2), 89-100.

Bharti, Rajendra Kumar (2012). DNA Representation, DNA Sequencing - Methods and Applications, Dr. Anjana Munshi (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/36956. Available from: <http://www.intechopen.com/books/dna-sequencing-methods-and-applications/dna-representation>.

Blewett, D.A. (1989). Disinfection and oocysts, in Proc. 1st Int. Workshop on Cryptosporidiosis, Angus, K.W. and Blewett, D.A., Eds., September 7–8, 1988, Edinburgh, 107–115.

(C)

Caccio`, S.M. (2005). Molecular epidemiology of human Cryptosporidiosis. *Parassitologia*, 47(2), 185-192.

Cacciò, S. M., Sannella, A. R., Mariano, V., Valentini, S., Berti, F., Tosini, F., and Pozio, E. (2013). A rare *Cryptosporidium parvum* genotype associated with infection of lambs and zoonotic transmission in Italy. *Veterinary parasitology*, 191(1), 128-131.

Cacciò, S. M., and Widmer, G. (Eds.). (2013). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer Science and Business Media.

Cama, V. A., Bern, C., Roberts, J., Cabrera, L., Sterling, C. R., Ortega, Y., ... and Xiao, L. (2008). *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg Infect Dis*, 14(10), 1567-1574.



- Carnevale, S., Velásquez, J. N., Labbé, J. H., Chertcoff, A., Cabrera, M. G., and Rodríguez, M. I. (2000). Diagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* by PCR in stool samples eluted from filter paper disks. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7(3), 504-506.
- Carreno, R.A., Martin, D.S. and 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(11), 899-904.
- Casemore, D.P., (1991). Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology* 44, 445-451
- Castro-Hermida, J. A., García-Presedo, I., Almeida, A., González-Warleta, M., Da Costa, J. M. C., & Mezo, M. (2009). Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. *Water research*, 43(17), 4133-4142.
- Cevallos, A.M., Zhang, X., Waldor, M.K., Jaison, S., Zhou, X., Tzipori, S., Neutra, M.R. and Ward, H.D. (2000). Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infection and Immunity*, 68(7), 4108-4116.
- Chalmers, R. M., Campbell, B. M., Crouch, N., Charlett, A., and Davies, A. P. (2011). Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *Journal of medical microbiology*, 60(11), 1598-1604.
- Chalmers, R.M., and Giles, M. (2010). Zoonotic cryptosporidiosis in the UK – challenges for control. *Journal of applied microbiology*, 109(5), 1487-1497.
- Chen, X. M., Keithly, J. S., Paya, C. V., & LaRusso, N. F. (2002). Cryptosporidiosis. *New England Journal of Medicine*, 346(22), 1723-1731.
-



- Clark, J.J. (1894–95). A study of coccidia met with in mice. *J. Micro. Sci.* 37, 277–283.
- Collee, J.G., fraser, A.G., Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). Mackie and McCartney, practical Medical Microbiology, 14th edition. *Churchil living stone*, New York.
- Coupe, S., Sarfati, C., Hamane, S., and Derouin, F. (2005). Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *Journal of clinical microbiology*, 43(3), 1017-1023.
- Current, W.L. (1985). Cryptosporidiosis, a protozoologist's view of an emerging zoonosis. *Microecology and therapy*. 15, 165–200.
- Current, W.L. (1988). The biology of *Cryptosporidium*. *ASM News* 54, 605–611.

(D)

- Dillingham, R. A., Lima, A. A., and Guerrant, R. L. (2002). Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, 4(10), 1059-1066.
- Dietrich, D., Uhl, B., Sailer, V., Holmes, E. E., Jung, M., Meller, S., and Kristiansen, G. (2013). Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PloS one*, 8(10), e77771.
- Ditrich, O., Palkovic, L., Sterba, J., Prokopic, J., Loudova, J. and Giboda, M. (1991). The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. *Parasitology research*, 77(1), 44-47.
- Doherty, J.R., and Cleveland, J.L. (2013). Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *The Journal of clinical investigation*, 123(9), 3685-3692.
-



Downey, A.S. and Graczyk, T.K. (2007). Maximizing Recovery and Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts from Spiked Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Tissue Samples. *Applied and environmental microbiology*, 73(21), 6910-6915.

(E)

Eberhard, P. (2007). Color atlas of genetics. *Thieme, Stuttgart, New York*.

(F)

Fantry, L. (2000). Gastrointestinal infections in the immunocompromised host. *Current opinion in gastroenterology*, 16(1), 45-50.

Fayer, R. (1994). Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Applied and environmental microbiology*, 60(8), 2732-2735.

Fayer, R. (2004a) . *cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary parasitology*, 126(1), 37-56.

Fayer ,R. (2008). General biology. In: Fayer R, Xiao L (eds) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, pp 1–42.

Fayer, R., Dubey, J.P. and Lindsay, D.S. (2004b). Zoonotic protozoa, from land to sea. *Trends in parasitology*, 20(11), 531-536.

Fayer, R., Morgan, U. and Upton, S. j. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium* : transmission , detection and identification. *International journal for parasitology*, 30(12), 1305-1322.

Fayer, R. and Nerad, T. (1996). Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and environmental microbiology*, 62(4), 1431-1433.

Fayer, R., Nerad, T., Rall, W., Lindsay, D.S. and Blagburn, B.L. (1991). *Studies on cryopreservation of Cryptosporidium parvum*. *The Journal of parasitology*, 357-361.



- Fayer, R., Santin, M. and Xiao, L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of parasitology*, 91(3), 624-629.
- Fayer, R., Speer, C.A. and Dubey, J.P. (1990). General biology of *Cryptosporidium*, in *Cryptosporidiosis of Man and Animals*, Dubey, J.P., Speer, C.A. and Fayer, R., Eds., *CRC Press*, Boca Raton, FL, pp. 1-29.
- Fayer, R., Trout, J.M. and Jenkins, M.C. (1998). Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *The Journal of parasitology*, 1165-1169.
- Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U., Lal, A.A. and Dubey, J.P. (2001). *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology*, 87(6), 1415-1422.
- Fleta, J., Sanchez-Acedo, C., Clavel, A. and Quilez, J. (1995). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extraintestinal tissues of sheep and pigs. *Veterinary parasitology*, 59(3), 201-205.
- Freites, A., Colmenares, D., Pérez, M., Garcia, M., and Díaz, D. S. O. (2009). *Cryptosporidium* sp infections and other intestinal parasites in food handlers from Zulia state, Venezuela. *Investigacion clinica*, 50(1), 13-21.
- Fujikawa, H., Miyakawa, H., Iguchi, K., Nishizawa, M., Moro, K., Nagai, K. and Ishibashi, M. (2002). Intestinal cryptosporidiosis as an initial manifestation in a previously healthy Japanese patient with AIDS. *Journal of gastroenterology*, 37(10), 840-843.

(G)

- Gallas-Lindemann, C., Sotiriadou, I., Plutzer, J., Noack, M. J., Mahmoudi, M. R., and Karanis, P. (2016). *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. dissemination during wastewater treatment and comparative detection via immunofluorescence assay (IFA),
-

- nested polymerase chain reaction (nested PCR) and loop mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta tropica*, 158, 43-51.
- Garcia, L. S., and Shimizu, R. Y. (1997). Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1526-1529.
- Gatei, W., Greensill, J., Ashford, R.W., Cuevas, L.E., Parry, C.M., Cunliffe, N.A., Beeching, N.J. and Hart, C.A. (2003). Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1458-1462.
- Gardner, M. J., Bishop, R., Shah, T., De Villiers, E. P., Carlton, J. M., Hall, N., ... and Wilson, R. J. (2005). Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science*, 309(5731), 134-137.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., ... and Paulsen, I. T. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419(6906), 498-511.
- Georgopoulou, I. and Tsiouris, V.(2008). The potential role of migratory birds in the transmission of zoonoses. *Vet Ital*, 44(4), 671-677.
- Gibson, S.V. and Wagner, J.E. (1986). Cryptosporidiosis in guinea pigs: a retrospective study. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189(9), 1033-1034.
- Glaberman, S., Sulaiman, I.M., Bern, C., Levior, J., Peng, M.M., Morgan, U., Gilman, R., Lal, A.A. and Xiao, L. (2001). A multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium meleagridis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(s1) 19–22S.
-



- Gobet, P., Buisson, J.C., Vagner, O., Naciri, M., Grappin, M., Comparot, S., Harly, G., Aubert, D., Varga, I., Camerlynck, P. and Bonnin, A. (1997). Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in Formed Human Feces by a Sensitive PCR-Based Assay Including Uracil-N-Glycosylase Inactivation. *Journal of clinical microbiology*, 35(1), 254-256.
- Gonçalves, E., Araújo, R. S., Orban, M., Matté, G. R., Matté, M. H., and Corbett, C. E. (2008). Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50(3), 165-167.
- Graczyk, T.K., Cranfield, M.R., Fayer, R., and Anderson, M.S. (1996a). Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. *Applied and environmental microbiology*, 62(9), 3234-3237.
- Graczyk, T.K., Fayer, R. and Cranfield, M.R. (1996b). *Cryptosporidium parvum* is not transmissible to fish, amphibia, or reptiles. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43(5). 82, 748–751.
- Graczyk, T.K., Fayer, R., Knight, R., Mhangami-Ruwende, B., Trout, J.M., da Silva, A.J., and Pieniazek, N.J. (2000). Mechanical transport and transmission of *Cryptosporidium parvum* oocysts by wild filth flies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 63(3),178–183.
- Graczyk, T.K., Kacprzak, M., Neczaj, E., Tamang, L., Graczyk, H., Lucy, F.E. and Girouard, A.S. (2008). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sewage sludge and solid waste landfill leachate and quantitative comparative analysis of sanitization treatments on pathogen inactivation. *Environmental research*, 106(1):27-33.
- Grimason, A. M., Smith, H. V., Thitai, W. N., Smith, P. G., Jackson, M. H., and Girdwood, R. W. A. (1993). Occurrence and removal of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in Kenyan waste stabilisation ponds. *Water Science and Technology*, 27(3-4), 97-104.
-



Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelievre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G., ... and Dei-Cas, E. (2001). Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates Obtained from Humans in France. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3472-3480.

(H)

Hallier-Soulier, S., and Guillot, E. (2000). Detection of cryptosporidia and *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water samples by immuno-magnetic separation-polymerase chain reaction. *Journal of applied microbiology*, 89(1):5-10.

Harp, J.A., Fayer, R., Pesch, B.A. and Jackson, G.J. (1996). Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 2866-2868.

Harris, J.R., Adrian, M. and Petry, F. (2003). Structure of the *Cryptosporidium parvum* microneme, a metabolically and osmotically labile organelle. *Micron* 34(2), 65-78.

Harris, J.R., Adrian, M. and Petry, F. (2004). Amylopectin, a major constituent of the residual body in *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitology* 128(03), 269-282.

Harris, J.R. and Petry, F. (1999). *Cryptosporidium parvum*, structural components of the oocyst wall. *The Journal of parasitology*, 839-849.

Hawash, Y. (2014). DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR. *The Korean journal of parasitology*, 52(3), 263-271.

Hellard, M., Hocking, J., Willis, J., Dore, G., and Fairley, C. (2003). Risk factors leading to *Cryptosporidium* infection in men who have sex with men. *Sexually transmitted infections*, 79(5), 412-414.



Higgins, J. A., Jenkins, M. C., Shelton, D. R., Fayer, R., and Karns, J. S. (2001). Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* for use in PCR. *Applied and environmental microbiology*, 67(11), 5321-5324.

Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ryan, U.M., Olson, M.E. and Thompson, R.C.A. (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(14), 1719–1726.

Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ng'anzo, M., Ryan, U.M., Olsen, M.E., Cox, P.T., Monis, P.T. ... and Thompson, R.C. (2004). Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International journal for parasitology*, 34(7), 769–777.

Hlavsa, M. C., Roberts, V. A., Anderson, A. R., Hill, V. R., Kahler, A. M., Orr, M., ... and Wade, T. J. (2011). Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events associated with recreational water—United States, 2007–2008. *MMWR Surveill Summ*, 60(12), 1-32.

Holscher, M.A. and Yardley, J.H. (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70, 592–598.

<http://us.bioneer.com/Protocol/AccuPrep%E2%84%A2%20Stool%20DNA%20Extraction%20Kit.pdf>.

<http://www.bio-rad.com/en-jo/applications-technologies/pcr-troubleshooting#gel1>.

<http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/api.html>

Huang, B.Q., Chen, X. M., and LaRusso, N. F. (2004). *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia in vitro: a morphological study. *Journal of Parasitology*, 90(2), 212–221.



Hubscher U, Spadari S, Villani G, Maga G (2010) DNA polymerases—discovery, characterization and functions in cellular DNA transactions. World Scientific Publishing Company, Singapore

Hunter, P. R., and Nichols, G. (2002). Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(1):145-154.

(I)

Iseki, M. (1979). *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn. apanese Journal of Parasitology*. 28, 285–307.

(J)

Jenkins, M. B., Bowman, D. D., and Ghiorse, W. C. (1998). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. *Applied and environmental microbiology*, 64(2), 784-788.

Jenkins, M., Trout, J., Higgins, J., Dorsch, M., Veal, D., and Fayer, R. (2002). Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitology research*, 89(1), 1-5.

Jex, A.R., Liu, S., Li, B., Young, N.D., Hall, R.S., Li, Y., and Chen, F. (2011). *Ascaris suum* draft genome. *Nature* 479(7374), 529–533.

(K)

Karim, M.R., Manshadi, F.D., Kariscak, M.M. and Gerba, C.P. (2004). The persistence and removal of enteric pathogens in constructed wetlands. *Water Research*, 38(7), 1831–1837.

Kato, S., Jenkins, M.B., Fogarty, E.A. and Bowman, D.D. (2002). Effects of freeze-thaw events on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in soil. *Journal of Parasitology*, 88(4), 718–722.



- Keegan , A., Daminato , D., Saint , C.P. and Monis . P.T. (2008). Effect of water treatment processes on *Cryptosporidium* infectivity. *Water research*, 42(6),1805 -1811.
- Keeley, A. and Faulkner, B. R. (2008). Influence of land use and watershed characteristics on protozoa contamination in a potential drinking water resources reservoir. *Water Research*, 42(10), 2803 -2813.
- Keithly, J.S., Langreth, S.G., Buttle, K.F. and Mannella, C.A. (2005). Electron tomographic and ultrastructural analysis of the *Cryptosporidium parvum* relict mitochondrion, its associated membranes, and organelles. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(2), 132–140.
- King, B.J., Keegan, A.R., Monis, P.T. and Saint, C.P. (2005). Experimental temperature controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. *Applied and environmental microbiology*, 71(7), 3848–3857.
- Kosek, M., Alcantara, C., Lima, A.A. and Guerrant, R.L. (2001). Cryptosporidiosis : an update. *The Lancet infectious diseases*, 1(4), 262-269.
- Kozwicz, D., Johansen, K. A., Landau, K., Roehl, C. A., Woronoff, S. and Roehl, P. A. (2000). Development of a novel, rapid integrated *Cryptosporidium parvum* detection assay. *Applied and environmental microbiology*, 66(7), 2711–2717.
- Kuczynska, E., Shelton , D. R., and Pachepsky , Y. (2005). Effect of bovine manure on *Cryptosporidium parvum* oocyst attachment to Ssoil. *Applied and environmental microbiology*, 71(10), 6394-6397.
- Kváč, M., Květoňová, D., Sak, B., and Ditrich, O. (2009). *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. *Emerg Infect Dis*, 15(6), 982-983.
-



(L)

- Laberge, I., Ibrahim, A., Barta, J.R. and Griffiths, M.W. (1996). Detection of *Cryptosporidium parvum* in Raw Milk by PCR and Oligonucleotide Probe Hybridization. *Applied and environmental microbiology*.62(9): 3259-3264.
- Lalonde, L.F. and Gajadhar ,A.A. (2009). Effect of storage media, temperature, and time on preservation of *Cryptosporidium parvum* oocysts for PCR analysis. *Veterinary parasitology*.160(3),185-189.
- Lampel, K. A., Orlandi, P. A. and Komegay, L. (2000). Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(10), 4539–4542.
- Langer, R.C. and Riggs M.W. (1999). *Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. *Infection and immunity*. 67(10), 5282–5291.
- Langer, R.C., Schaefer, D.A. and Riggs, M.W. (2001). Characterization of an intestinal epithelial cell receptor recognized by the *Cryptosporidium parvum* sporozoite ligand CSL. *Infection and immunity*. 69(3), 1661–1670.
- Lasser, K.H., Lewin, K.J. and Rynning, F.W. (1979). Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Human pathology*. 10(2), 234–240.
- Le, A., Cooper, C.R., Gouw, A.M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L.M., ... and Dang, C.V. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2037–42.
- Leander, B.S., Clopton, R.E. and Keeling, P.J. (2003). Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA
-



- and β -tubulin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53(1), 345–354.
- Leav, B.A., Mackay, M. and Ward, H.D. and Acheson, D (2003). *Cryptosporidium* species: new insights and Old challenges. *Clinical Infectious Diseases*. 36(7), 903 - 908.
- Lee, M.B., and Greig, J.D. (2010). A review of gastrointestinal outbreaks in schools: effective infection control interventions. *Journal of School Health* 80(12), 588–598.
- Leoni, F., Amar, C., Nichols, G., Pedraza-Diaz, S. and McLauchlin, J. (2006). Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *Journal of medical microbiology*. 55(6), 703–707.
- Limor, J. R., Lal, A.A. and Xiao, L. (2002). Detection and Differentiation of *Cryptosporidium* Parasites That Are Pathogenic for Humans by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*.40(7):2335-2338.
- Lorenzo, M. L., Ares-Mazas, E., and De Maturana, I. V. M. (1993). Detection of oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic adult cattle. *Veterinary Parasitology*, 47(1), 9-15.
- Lucy, F.E., Graczyk, T. K., Tamang, L., Miraflor, A. and Minchin, D. (2008). Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. *Parasitology research*. 103(6), 1369-1375.
- Lumb, R., Smith, K., O'Donoghue, P.J. and Lanser, J.A. (1988). Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitology research*. 74(6), 531–536.

(M)

- Mackay, I. M., Arden, K. E., and Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30(6), 1292-1305.
-



- Mackay, I.M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), 190-212.
- Mackenzie, 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. and Davis, J.P. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England journal of medicine*, 331(3), 161-167.
- Macpherson, D. W. and Mcqueen, R. (1993). Cryptosporidiosis; multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *Journal of clinical microbiology*, 31(2), 198-202.
- Maggi, P., Larocca, A. M. V., Quarto, M., Serio, G., Brandonisio, O., Angarano, G., and Pastore, G. (2000). Effect of antiretroviral therapy on cryptosporidiosis and microsporidiosis in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(3), 213-217.
- Mahdi, N.K. and Ali, N.H. (2002). Intestinal Parasitic (Including *Cryptosporidium*) Infections in Day-Care Centres. *Bahrain Medical Bulletin*.24(4):1-6.
- Mamedov TG, Pienaar E, Whitney SE, TerMaat JR, Carvill G, Goliath R, Subramanian A, Viljoen HJ (2008) A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Comput Biol Chem* 32:452–457. doi:10.1016/j.compbiolchem.2008.07.021.
- Matavos-Aramyan, S., Moussavi, M., Matavos-Aramyan, H., and Roozkhosh, S. (2017). *Cryptosporidium*-contaminated water disinfection by a novel Fenton process. *Free Radical Biology and Medicine*, 106, 158-167.
- Matschoultsky, S. N. (1947). Coccidia of wild birds in Buryatii, 2nd report. *Trudy Buryet-Mongol'skoi Zooveterinarnogo Instituta*, 3, 93-101.
-

- McEvoy, J.M., Duffy, G., Moriarty, E. M., Lowery, C.J., Sheridan, J. J., Blair, I.S. and McDowell, D.A. (2005). The prevalence and characterisation of *Cryptosporidium* spp. In beef abattoir water supplies. *Water research*. 39(15), 3697-3703.
- McLauchlin, J., Pedraza-Diaz, S., Amar-Hoetzeneder C., and Nichols, G.L. (1999). Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(10), 3153–3158.
- Medema, G., Teunis, P., Blokker, M., De Boer, D., Davison, A., Charles, P. and Loret, J.F. (2006). WHO guide lines for drinking water quality: *cryptosporidium*. WHO, New York, 138.
- Mehran, M. Q. S., and Javid, S. (2017). An examination of *Cryptosporidium parvum* infection in neonate BALB/c mice and rats. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2011(3, Summer), 185-190.
- Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C. and Rubin, C.E. (1976). Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70(6), 1156–1160.
- Meutin, D.J., Van Kruiningen, H.J. and Lein, D.H. (1974). Cryptosporidiosis in a calf. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 165(10), 914–917.
- Miller, W. A., Atwill, E. R., Gardner, I. A., Miller, M. A., Fritz, H. M., Hedrick, R. P., ... and Conrad, P. A. (2005). Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. *International journal for parasitology*, 35(6), 673-684.
- Mor, S. M., Tumwine, J. K., Ndeezi, G., Srinivasan, M. G., Kaddu-Mulindwa, D. H., Tzipori, S., and Griffiths, J. K. (2010). Respiratory cryptosporidiosis in HIV-seronegative children in
-



- Uganda: potential for respiratory transmission. *Clinical Infectious Diseases*, 50(10), 1366-1372.
- Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Payer, R., ... and Xiao, L. (2002). *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(6), 433-440.
- Morgan, U. M., Sargent, K. D., Deplazes, P., Forbes, D. A., Spano, F., Hertzberg, H., ... and Thompson, R. C. A. (1998a). Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology*, 117(01), 31-37.
- Morgan, U.M. and Thompson, R.C.A. (1998b). PCR Detection of *Cryptosporidium*: The Way Forward?. *Parasitology Today*.14(6), 241-245.
- Morrison, L. (1998). Cryptosporidiosis. TAG : The OI Report., : 1 – 9.

(N)

- Nakamura, A.A., Simoes, D.C., Antunes, R.G., Silva, D.C. and Meireles, M.V. (2009). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. *Veterinary parasitology*, 166(1), 47-51.
- Newman, R. D., Zu, S. X., Wuhib, T., Lima, A. A., Guerrant, R. L., and Sears, C. L. (1994). Household Epidemiology of *Cryptosporidium parvum* Infection in an Urban Community in Northeast Brazil. *Annals of Internal Medicine*, 120(6), 500-505.
- Nichols, G., Chalmers, R., Lake, I., Sopwith, W., Regan, M., Hunter, P., ... and Lane, C. (2006). Cryptosporidiosis: a report on the surveillance and epidemiology of *Cryptosporidium* infection in England and Wales. *Drinking Water Directorate Contract Number DWI*, 70(2), 201.
- Nmrosi, O.P.G., Ukwandu, N.C.D. and Agbozele ,G.E. (2006). Detection of some gastrointestinal parasites from four synanthropic flies in



Ekpoma, Nigeria. *Journal of vector borne diseases*, 43(3), 136-139.

Nokes, R.L., Gerba, C.P. and Karpiscak, M.M. (2003). Microbial water quality improvement by small scale onsite subsurface wetland treatment. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 38(9), 1849–1855.

Nouri, M. and Toroghi, S. (1991). Asymptomatic cryptosporidiosis in cattle and humans in Iran. *Veterinary Record*, 128(15), 358-359.

(Q)

O'Hara, S.P., Huang, B.Q., Chen, X. M., Nelson, J. and LaRusso, N.F. (2005). Distribution of *Cryptosporidium parvum* sporozoite apical organelles during attachment to and internalization by cultured biliary epithelial cells. *Journal of Parasitology*, 91(5), 995-999.

OIE, (2008). Chapter 2 . 9 . 4 .CRYPTOSPORIDIOSIS, OIE , terrestrial manual,OIE.:1192 -1215.pp.

Oikarinen, S., Tauriainen, S., Viskari, H., Simell, O., Knip, M., Virtanen, S., and Hyöty, H. (2009). PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *Journal of Clinical Virology*, 44(3), 211-214.

Orlandi, P. A., and Lampel, K. A. (2000). Extraction-free, filter-based templatepreparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasiticprotozoa. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6), 2271-2277.

(P)

Painter, J. E., Hlavsa, M. C., Collier, S. A., Xiao, L., and Yoder, J. S. (2015). Cryptosporidiosis surveillance—United States, 2011–2012. *MMWR Surveill Summ*, 64(Suppl 3), 1-14.



- Pancieria, R.J., Thomassen, R.W. and Garner, F.M. (1971). Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology Online*, 8(5-6), 479-484.
- Paul, S., Chandra, D., Tewari, A. K., Banerjee, P. S., Ray, D. D., Boral, R., and Rao, J. R. (2009). Comparative evaluation and economic assessment of coprological diagnostic methods and PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in bovines. *Veterinary parasitology*, 164(2), 291-295.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Iversen, A.M., Stanley, P.J. and Mclauchlin, J. (2001). Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces : first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* dog type from patients in England. *Journal of medical microbiology*, 50(3), 293-296.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C. and McLauchlin, J.(2000). The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiology Letters*, 189(2), 189-194.
- Peng, M.M., Xiao, L., Freeman, A.R. Arrowood, M. J., Escalante, A. A., Weltman, A. C., ... and Beard, C. B. (1997). Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging infectious diseases*, 3 (4):567–573.
- Peterson, C. (1992). Cryptosporidiosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*, 15(6), 903-909.
- Peterson, C. (1998). Cryptosporidiosis, cyclosporiasis and isosporiasis in the setting of HIV infection. HIV Insite Knowledge base Chapter.
- Piper, M.B., Bankier, A.T., and Dear, P.H. (1998). A HAPPY map of *Cryptosporidium parvum*. *Genome research*, 8(12), 1299-1307.
- Plutzer, J. and Tomor, B. (2009). The role of aquatic birds in the environmental dissemination of human pathogenic *Giardia*
-



duodenalis cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Hungary. *Parasitology international*, 58(3), 227-231.

Pohlenz J, Bemrick W.J, Moon H.W., and Cheville, N. F. (1978) Bovine cryptosporidiosis: a transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host-parasite relationship. *Veterinary Pathology Online*, 15(3), 417-427.

Potters, I., and Van Esbroeck, M. (2010). Negative staining technique of Heine for the detection of *Cryptosporidium* spp.: a fast and simple screening technique. *The Open Parasitology Journal*, 1,1-4.

Primrose, S. B., and Twyman, R. (2013). *Principles of gene manipulation and genomics*. John Wiley and Sons.

Putignani, L. (2005). The unusual architecture and predicted function of the mitochondrion organelle in *Cryptosporidium parvum* and *hominis* species, the strong paradigm of the structure-function relationship. *Parassitologia*, 47(2), 217-225.

(Q)

Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., Clavel, A., delcacho, E. and Lopez-Bernad, F. (1996). Comparison of an acid-fast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from cattle and pigs. *Veterinary parasitology*, 67(1), 75-81.

(R)

Radke, J.R., Behnke, M.S., Mackey, A.J., Radke, J.B., Roos, D.S., and White, M.W. (2005). The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC biology*, 3(1), 26.

Rajeshkumar, N.V., Dutta, P., Yabuuchi, S., de Wilde, R.F., Matrinez, GV., Le, A., ... and Dang, C. V. (2015). Therapeutic targeting of the



- Warburg effect in pancreatic cancer relies on an absence of p53 function. *Cancer research*, 75(16), 3355-3364.
- Ramirez, N.E., Ward, L.A. and Sreevatsan, S. (2004). A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and infection*, 6(8), 773-785.
- Reduker, D.W., Speer, C.A. and Blixt, J.A. (1985). Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. *The Journal of protozoology*, 32(4), 708–711.
- Rieux, A., Paraud, C. and Pors, I., and Chartier, C. (2013). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. In pre-weaned kids in a dairy goat farm in western France. *Veterinary parasitology*, 192(1), 268–272.
- Riggs, M.W. (2002). Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes and Infection*, 4(10), 1067-1080.
- Riggs, M.W., Stone, A.L., Yount, P.A., Langer, R.C., Arrowood, M.J. and Bentley, D. L. (1997). Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. *The Journal of Immunology*, 158(4), 1787–1795.
- Robertson, L.J., and Chalmers, R.M. (2013). Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in Nordic countries? *Trends in parasitology*, 29(1), 3–9.
- Rose, J.B., Huffman, D.E., and Gennaccaro, A. (2002). Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 113–23.
- Roux, K. H. (1995). Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Research*, 4(5), S185-S194.
- Ryan, U.M. (2010). *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental parasitology*, 124(1), 113-120.
-



Ryan, U.M., Monis, P., Enemark, H.L., Sulaiman, I., Samarasinghe, B., Read, C. Buddle, R., Robertson, I., Zhou, L., Thompson, R.C. and Xiao, L. (2004). *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*, 90(4), 769–773.

Rzezutka, A., Nichols, R. A. B., Connelly, L. Kaupke, A., Kozyra, I., Cook, N., ... and Smith, H. V. (2010). *Cryptosporidium* oocysts on fresh produce from areas of high livestock production in Poland. *International journal of food microbiology*, 139(1), 96–101.

(S)

Sam-Yellowe, T.Y. (1996). Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitology Today*, 12(8), 308–316.

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L, and Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*, 113(5), 1014 -1026 .

Semenza, J. C., and Nichols, G. (2007). Cryptosporidiosis surveillance and water-borne outbreaks in Europe. Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin, 12(5), E13-4.

Sharbatkhori, M., Kia, E.B., Harandi, M.F., Jalalizand, N., Zahabiun , F. and Mirhendi , H. (2009). Comparison of Five Simple Methods for DNA extraction from *Echinococcus granulosus* Protoscoleces for PCR- Amplification of Ribosomal DNA. *Iranian Journal of Parasitology*, 4(2), 54-60.

Shehabi, A. A. and Karmi, B. A. (1992). Cryptosporidiosis in hospitalized patients in Jordan. *Jordan Med. J*, 26 (2), 167 – 170.

Shirley, M. (1994). The genome of *Eimeria tenella*: further studies on its molecular organisation. *Parasitology research*, 80(5), 366–373.



- Shirley, M.W. (2000). The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella*—a coccidium from the chicken. *International journal for parasitology*, 30(4), 485–493.
- Siddiki, A. Z., Mina, S. A., Farzana, Z., Ayesa, B., Das, R., and Hossain, M. A. (2015). Molecular characterization of *Cryptosporidium xiaoi* in goat kids in Bangladesh by nested PCR amplification of 18S rRNA gene. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(3), 202-207.
- Siwila, J., Phiri, I. G., Vercruyse, J., Goma, F., Gabriel, S., Claerebout, E., and Geurden, T. (2007). Asymptomatic cryptosporidiosis in Zambian dairy farm workers and their household members. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(7), 733-734.
- Slapeta, J. (2006). *Cryptosporidium* species found in cattle, a proposal for a new species. *Trends in parasitology*, 22(10), 469–474.
- Slavin, D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of comparative pathology and therapeutics*, 65, 262–270.
- Smith, H. (2008). Diagnostic in: Fayer, R. and Xiao, L. editors. "*Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis" 2ed edition. Taylors and Francis Group., USA: 173-207 pp.
- Smith, H. V., and Nichols, R. A. (2010). *Cryptosporidium*: detection in water and food. *Experimental parasitology*, 124(1), 61-79.
- Smith, H.V., Nichols, R.A., and Grimason ,A.M. (2005). *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in parasitology*, 21(3), 133–142.
- Smith, A., Reacher, M., Smerdon, W. Adak, G. K., Nichols, G., and Chalmers, R. M. (2006). Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. *Epidemiology and infection*, 134(06), 1141–1149.
- Soderquist, R.S., Danilov, A.V., and Eastman, A. (2014). Gossypol increases expression of the pro-apoptotic BH3-only protein
-

- NOXA through a novel mechanism involving phospholipase A2, cytoplasmic calcium, and endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry*, 289(23), 16190-16199
- Soderquist, R., Bates, D.J., Danilov, A.V., and Eastman, A. (2013). Gossypol overcomes stroma-mediated resistance to the BCL2 inhibitor ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia cells ex vivo. *Leukemia*, 27(11), 2262-2264.
- Spano F, Putignani L, Crisanti A., Sallicandro, P., Morgan, U. M., Le Blancq, S. M., ... and Widmer, G. (1998a) Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(11), 3255–3259.
- Spano, F., Putignani, L., Naitza, S., Puri, C., Wright, S. and Crisanti, A. (1998b). Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Molecular and biochemical parasitology*, 92(1), 147–162.
- Śpibida, M., Krawczyk, B., Olszewski, M., and Kur, J. (2016). Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. *Journal of Applied Genetics*, 1-10.
- Stephen, A.M., and Cummings, J.H. (1980). The microbial contribution to human fecal mass. *Journal of Medical Microbiology*, 13(1), 45-56.
- Stott, R., May, E., Ramirez, E. and Warren, A. (2003). Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers, implications for water quality and public health. *Water Science and Technology*, 47(3), 77–83.
- Sulaiman, I.M., Hira, P.R., Zhou, L., Al-Ali, F.M., Al-Shelahi, F.A., Shweiki, H.M., Iqbal, J., Khalid, N. and Xiao, L. (2005). Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *Journal of clinical microbiology*, 43(6), 2805–2809.
-



- Sulaiman, I.M., Xiao, L., Yang, C. Escalante, L., Moore, A., Beard, C. B., ... and Lal, A. A. (1998). Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerging infectious diseases*, 4(4), 681–685.
- Sunderland, D., Graczyk, T. K., Tamang, L. and Breysse, P.N. (2007). Impact of bathers on levels of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach waters. *Water research*, 41(15), 3483-3489.
- Surl, C. G., and Park, B. K. (2011). Resistance of *Cryptosporidium parvum* oocysts following commercial bleach treatment. *Korean J Vet Res* ; 51, 101-105.
- Szostakowska, B., Kruminis-Lozowska, W., Racewicz, M., Knight, R., Tamang, L., Myjak, P., and Graczyk, T. K. (2004). *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* recovered from flies on a cattle farm and in a landfill. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3742-3744.

(T)

- Tamburrini. , A. and Pozio , E.(1999). Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology*, 29(5), 711-715.
- Tanyüksel, M., Gün, H., and Doganci, L. (1995). Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with neoplasia and diarrhea. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 27(1), 69-70.
- Tatfeng , Y.M., Usuanlele, M.U., Orukpe, A., Digban, A.K., Okodua, M., Oviasogie, F. and Turay, A. A. (2005). Mechanical transmission of pathogenic organisms: the role of Cockroaches. *Journal of vector borne diseases*, 42(4), 129-134.
- Thurston, J. A., Foster, K. E., Karpiscak, M. M., and Gerba, C. P. (2001). Fate of indicator microorganisms, *Giardia* and *Cryptosporidium*



in subsurface flow constructed wetlands. *Water Research*, 35(6), 1547-1551.

Topp, E., Scott, A., Lapen, D.R., Lyautey, E. and Duriez, P. (2009). Livestock waste treatment systems for reducing environmental exposure to hazardous enteric pathogens: Some considerations. *Bioresource technology*, 100(22), 5395-5398.

Tyzzer, E.E. (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Experimental Biology and Medicine*, 5(1), 12–13.

Tyzzer, E.E. (1910). An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of medical research*, 23(3), 487–511.

Tyzzer, E.E. (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd*, 26, 394–412.

Tyzzer, E.E. (1929). Coccidiosis in gallinaceous birds. *Am. American Journal of Epidemiology*, 10(2), 269–383.

Tzipori, S. (1998). Cryptosporidiosis: laboratory investigations and chemotherapy. *Advances in parasitology*, 40, 187-221.

Tzipori, S. and Ward, H. (2002). Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4(10), 1047-1058.

(U)

Umemiya, R., Fukuda, M., Fujisaki, K. and Matsui, T. (2005). Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice, *Journal of Parasitology*, 91(5), 1034-1039.



Upton, S. J., and Current, W. L (1985). the species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa; Cryptosporidiae) infecting mammals. *The Journal of parasitology*.71(5): 625-629.

(V)

Valenzuela, O., González-Díaz, M., Garibay-Escobar, A., Burgara-Estrella, A., Cano, M., Durazo, M., *et al.* (2014) Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Children from Mexico. *PLoS ONE* 9(4): e96128. doi:10.1371/journal.pone.0096128.

Vander Jagt, D. L., and Royer, R. E. (2000). Gossypol prototype of inhibitors targeted to dinucleotide folds. *Current medicinal chemistry*, 7(4), 479-498.

Vetterling, J.M. and Doran, D.J. (1969). Storage polysaccharide in coccidial sporozoites after excystation and penetration of cells. *The Journal of protozoology*, 16(4), 772-775.

Vinayak, S., Pawlowic, M. C., Sateriale, A., Brooks, C. F., Studstill, C. J., Bar-Peled, Y., ... and Striepen, B. (2015). Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Nature*.. 523(7561):477–80.

(W)

Walker, M. and Redelman, D. (2004). Detection of *Cryptosporidium parvum* in Soil Extracts. *Applied and environmental microbiology*, 70 (3), 1827-1829.

Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57–63.

Warid, H. S. (2010). *Study in epidemiology and PCR detection of cryptosporidiosis in north of Baghdad* (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis. Department of Biology, College of Science, University of Baghdad. Baghdad, Iraq).

- Warren, C. and Guerrant, R. (2008). Clinical Disease and Pathology. In: Fayer R, Xiao L, editors. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd ed. Boca Raton, FL: CDC Press; 235–54.
- Watson, R. J., and Blackwell, B. (2000). Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(7), 633-642.
- Weaver, R. (2012). Molecular Cloning Methods. In: Weaver R, (eds) Molecular Biology. McGraw-Hill Companies, pp, 62.
- Webster, K. A., Green, J. A., Dawson, C., Giles, M. and Catchpole, J. (1996). Diagnostic methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in faeces. *J. Protozool. Res.*, 6, 113 – 120.
- Weir, S. C., Pokorny, N. J., Carreno, R. A., Trevors, J. T., and Lee, H. (2002). Efficacy of common laboratory disinfectants on the infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cell culture. *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2576-2579.
- Weisburger, W.R., Hutcheon, D.F., Yardley, J.H., Roche, J.C., Hillis, W.D. and Charache, P. (1979). Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal-transplant recipient with IgA deficiency. *American journal of clinical pathology*, 72(3), 473-478.
- Wetzel, R. (1938). Ein neues Coccid (*Cryptosporidium vulpis* sp. nov.) aus dem Rotfuchs. *Arch. Wissenschaft. Prak. Tier*, 74, 39-40.
- Wetzel, D.M., Schmidt, J., Kuhlenschmidt, M.S., Dubey, J.P. and Sibley, L.D. (2005). Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infection and immunity*, 73(9), 5379-5387.
- Widmer, G. Klein, P. Bonilla, R. (2007). Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology*, 134(11), 1583–1588.
-



Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 3741–3751.

WHO. (2009). Risk Assessment of *Cryptosporidium* in Drinking Water. WHO/HSE/WSH/09.04 .Geneva ,WHO:134 pp.

<http://www.genetbio.co.kr/en/index.html>.
www.ncbi.com

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/5916197?report=graph

(X)

Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental parasitology*, 124(1), 80-89.

Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R.H. and Lal, A.A. (2001a). Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases*, 183(3), 492-497.

Xiao, L., and Cama, V., (2006). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in: Ortiga, Y. editor."Food Born Parasitology". Springer Science .,USA:289 pp.

Xiao, L., Cama, V.A., Cabrera, L., Ortega, Y., Pearson, J. and Gilman, R. H. (2007). Possible Transmission of *Cryptosporidium canis* among Children and a Dog in a Household. *Journal of clinical microbiology*.45(6): 2014–2016.

Xiao, L., Escalante, A., Yang ,C., Sulaiman , I., Escalante, A.A, Montali, R.J., Fayer, R. and Lal, A.A. (1999a). Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and environmental microbiology*, 65(4), 1578-1583.

Xiao, L., Fayer,R., Ryan,U.M. and Upton, S.J. (2004a). *Cryptosporidium* taxonomy :recent advances and implications for public health. *Clinical microbiology reviews*, 17(1), 72-97.



- Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., ... and Lal, A. A. (1999b). Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and environmental microbiology*, 65(8), 3386-3391.
- Xiao, L. and Ryan, U.M.(2004b).Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current opinion in infectious diseases*, 17(5), 483-490.
- Xiao, L., Singh, A., Limor, J., Graczyk, T. K., Gradus, S. and Lal, A. (2001b). Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Oocysts in Samples of Raw Surface Water and Wastewater. *Applied and environmental microbiology*, 67(3), 1097-1101.
- Xiao, S., An, W., Chen, Z., Zhang, D., Yu, J., and Yang, M. (2012). The burden of drinking water-associated cryptosporidiosis in China: the large contribution of the immunodeficient population identified by quantitative microbial risk assessment. *Water research*, 46(13), 4272-4280.
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L. S., Alves, J. M., Serrano, M. G., ... and Pearson, W. R. (2004). The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, 431(7012), 1107-1112.

(Y)

- Yacoub, M .M. M. (2014). Intestinal protozoa and *Cryptosporidium* genotypes in North of West bank/Palestine. Master thesis of Life Sciences (Biology), Faculty of Graduate Studies, An-Najah National University. West bank, Palestine.
- Yoder, J.S., Beach, M.J., and Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2007). Cryptosporidiosis surveillance-United States, 2003–2005. *MMWR Surveill Summ*, 56(7), 1-10.
-

- Yoder, J.S., Harral, C., Beach, M.J., and Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010). Cryptosporidiosis surveillance – United States, 2006–2008. *MMWR Surveill Summ*, 59(6), 1-14.
- Yokoi , H., Tsuruta , M., Tanaka , T., Tsutake, M., Akiba , Y., Kimura, T., Tokita , Y., akimoto , T., Mitsui , Y., Ogasawara, A. and Ikegami, H. (2005). *Cryptosporidium* Outbreak in Sport Center. *Japanese journal of infectious diseases*, 58(5), 331 -332.
- Yoshida, H., Matsuo, M., Miyoshi, T., Uchino, K., Nakaguchi, H., Fukumoto, T., *Ternaka*,Y. and Tanaka ,T. (2007). An Outbreak of Cryptosporidiosis Suspected to be Related to Contaminated food , October 2006 ,Sakai City ,Japan. *Jpn. apnese journal of infectious diseases*, 60(6), 405 -407.
- Young, N. D., Jex, A. R., Li, B., Liu, S., Yang, L., Xiong, Z., ... and Chen, F. (2012). Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nature genetics*, 44(2), 221-225.
- Youssef, M. Y., Khalifa, A. M., and El Azzouni, M. Z. (1998). Detection of Cryptosporidia in different water sources in Alexandria by monoclonal antibody test and modified Ziehl Neelsen stain. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 28(2), 487-496.
- Yu, Y., Deck, J.A., Hunsaker, L.A., Deck, L.M., Royer, R.E., Goldberg, E., and Vander Jagt, D. L. (2001). Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenases A4, B4, and C4. *Biochemical pharmacology*, 62(1), 81-89.

(Z)

- Zhang, H., Guo, F. and Zhu, G. (2015) *Cryptosporidium* lactate dehydrogenase is associated with the parasitophorous vacuole membrane and is a potential target for developing therapeutics. *PLoS Pathog* 11(11): e1005250.
-



Zhou, L., Kassa, H., Tischler, M. L. and Xiao, L. (2004). Host-Adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada Geese (*Branta canadensis*). *Applied and environmental microbiology*.70(7):4211-4215.

**University of Mosul
College of sciences**



**Diagnostic and Molecular Study for
Cryptosporidium sp in Some Areas of Dohuk
Province**

Thesis Submitted by

Muhammad Ismaeel Khaleel AL-Khaleel

Supervised By

Assist. Prof. Dr. Seena Abdullah Ali AL-jarjary

2017 A.D.

1438 A.H.

Summary

This study included the detection of the prevalence of cryptosporidiosis in children in Some Areas of Dohuk Province and referred children to Bardarash's , Khazer's health centers and in adults referred to Azadi hospital in different ages whose suffer gastroenteritis . method of staining by Modified Zeil- Neelsen stain was used to detect cryptosporidiosis and using Malachite green oxalate and Methylen Blue as a differential stains.

The infection rates of 77 stool samples was compared whence (sex , age , stool sample type and research period) . the resulte showed the total infection rates with cryptosporidiosis in tested samples was (29.87%) for both sexes. It was recorded %29.72of infection between males children and %30 was recorded between females children, the results showed significant relation between gender and infectivity rate ($p \leq 0.05$) . The infection is limited only between children in ages (3 months-7 years) for both sexes Where the infection rate for children between(3 months-2 years) was %42.42for both sexes and in proportion 39.13% for children in (3 years-7 years) old for both sexes, where one infection was record between females in 7 years old in proportion 2.5% Where the number of infections is decreasing whenever a person age increased, Therefore, no parasitic infection was recorded in children and adults who were of ages (8 years-33 years) and no significant relation between age and infectivity rate was recorded. the results revealed that incidence rate in diarrhea samples was 45.45% while the rate was 18.18% in samples of natural stool, the results showed no significant relation between fecal status and infectivity rate. The results also showed increase of incidence rate of injury in the months (May and June) and the proportion was 45.45%- 50% Respectively . While the lowest rate of the injury was (18.18%) for both of the months (January and February) and the results showed significant relation between study period and infectivity rate ($p \leq 0.05$).

In addition to microscopic examination for faecal samples the study included make an optimization conditions for conventional PCR technique to determine the presence of *Cryptosporidium parvum* parasite.

specific gene locus in the extracted DNA which were extracted by AccuPrep®Stool Genomic DNA Extraction kit , which is a general commercial kit to extract DNA from all microorganisms present in the stool and This extraction process was conducted according to the instructions of the company equipped with two sets of modulations on the two sets of