جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

دراسة شكلية وجزيئية لطفيلي البابيزيا وعزل وتشخيص القراد الناقل في الأبقار الخمجة في مدينة الموصل

إيمان غانم سليمان

أطروحة دكتوراه

الطب البيطري / الطفيليات البيطرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة

أحلام فتحي الطائي

1439هـ 2018م

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية تشخيص طفيلي الكمثرية البقرية *Babesia bovis* والكمثرية التوأمية *Babesia bigemina* في ٣٠٠ مسحة دموية محضرة ومصبوغة بصبغة الكيمزا جمعت من الأبقار من مدينة الموصل من الجنسين كليهما ومن أعمار مختلفة للفترة من بداية اذار ٢٠١٤ ولغاية نهاية ايار ٢٠١٤ . بلغت نسبة الإصابة الكلية بطفيلي *Babesia spp* والنوعين *B.bovis* و*B.bigemina* (٤٢,٣٣%) و(٣٠,٦٦%) و(٢٤,٣٣%) على التوالي . ظهرت المسحات الدموية المصبوغة بالكيمزا المضاف اليها 0.5% Triton x-100 بشكل واضح جدا وخالية من أي ترسبات للصبغة .شكل نمط الإصابة المفردة بالكمثرية البقرية أعلى نسبة وبلغت (٤٢,٥١٪) يليه نمط الاصابة المزدوجة بالنوعين ثم الإصابة المفردة بالكمثرية التوأمية إذ بلغت النسب (٢٩,٩٢٪) و(٢٧,٥٥٪) على التوالي واشارت النتائج الى عدم وجود فرق معنوي في نسبة الاصابة بين إناث وذكور الأبقار وبين الفئات العمرية المختلفة وذلك عند مستوى معنوية $p<0.05$.

تضمنت الدراسة الحالية امكانية استخدام صبغة الاكريدين البرتقالية المتفلورة في تشخيص *Babesia spp* في (٥٠) عينة دم ابقار والتي جمعت خلال الفترة من بداية تشرين الاول ٢٠١٧ ولغاية نهاية تشرين الثاني ٢٠١٧، وتميزت هذه الصبغة بسهولتها وسرعة استخدامها اذ تستغرق عملية التصبيغ من ٢-٥ دقائق وذلك باستخدام المجهر المتألق مقابل ٤٥ دقيقة لصبغة كيمزا باستخدام المجهر الضوئي، وتفيد صبغة الاكريدين البرتقالية في الدراسات الوبائية والمسحية وتحديد برامج السيطرة على داء الكمثريات . أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى أن نسبة إصابة الأبقار الكلية بالقراد الصلب بلغت (٢٩,٦٦٪) وشُخص كل من النوع *Hyalomma anatolicum anatolicum* و *Rhipicephalus sanguineus sanguineus* و*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ، كان النوع *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* هو الشائع في هذه الدراسة ولقد تم تشخيصه لأول مرة في مدينة الموصل وسجل نسبة إصابة (٤٩٪). شكل نمط الاصابة المفردة بنوع واحد من القراد اعلى نسبة ٤١٪ يليه كل من الإصابة بأكثر من نوعين والإصابة المزدوجة إذ بلغت النسب (٣٣٪) و (٢٦٪) على التوالي . لوحظ عدم وجود فرق معنوي في نسبة الإصابة بالقراد بين إناث وذكور الأبقار وذلك عند مستوى معنوية $p<0.05$ وإن أعلى نسبة للإصابة كانت عند عمر ٣-٥ سنة وبلغت (٥٨,٦٢٪) واقل نسبة للإصابة سجلت عند عمر ١- اقل من ٣ سنة (١٩,٦٨٪) وإن اعلى نسبة تواجد للقراد على جسم الحيوانات كانت في كل من منطقة الأطراف الخلفية (٣٨,٢٠٪) والضرع (٣٨,٢٠٪) واقل نسبة تواجد كانت في كل من الظهر والعنق (٥,٦١٪).

وأظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة الإصابة الكلية بطفيلي *Babesia spp* وبنوعيها *B.bovis* و*B.bigemina* ، ظهرت مرتفعة في الحالات الواردة إلى المستشفى التعليمي/ كلية الطب

البيطري وبلغت (٧٤,٠٤٪) وأقل نسبة إصابة سجلت في الأبقار المذبوحة في مجزرة الموصل وبلغت (34.78%) .أما أعلى نسبة للإصابة بالقراد فكانت في حقول كلية الزراعة والغابات، وبلغت(٦٨,٥٧٪) واقل نسبة للإصابة سجلت في مجزرة الموصل، إذ بلغت (7.24%) على التوالي.

وتبين من خلال فحص السائل الدموي اللمفي لإناث القراد المحتقنة بعد 5-٨ أيام من بقائها حية تحت ظروف المختبر أمكانية تشخيص دويدات *Babesia spp* في إناث قراد *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* واناث قراد *Hyalomma anatolicum anatolicum* وإناث قراد *Rhipicephalus sanguineus sanguineus* وبنسبة إصابة بلغت (٤٨,٤٣٪) و (٢٠٪) و (٤١,٦٦٪) على التوالي .تم تشخيص الأطوار التكاثرية (الأدوار الحلقية والأجسام الدائرية الغامقة اللون والمفلوقات) في جميع إناث قراد *Boophilus microplus* و١٠ اناث قراد *Hyalomma anatolicuma anatolicum* و٧ إناث *Rhipicephalus sanguineus* وبنسبة اصابة بلغت (١٠٠٪)و (٣٣,٣٣٪) و (٥٨,٣٣٪) على التوالي.

لوحظ انه توجد علاقة مباشرة وطردية بين نسبة التطفل لطفيلي *Babesia spp* في دم المضيف الفقري و عدد الدويدات المشخصة في إناث القراد كما لوحظ عدم وجود فرق معنوي بين عدد ونسبة اناث القراد المصابة بالدويدات والمجموعة من الأبقار بمختلف الفئات العمرية وذلك عند مستوى معنوية ($p<0.05$).

ان اتباع الطرائق البديلة (غير التجارية) في استخلاص الـ DNA من كل من دم الأبقار واناث القراد المحتقنة قد أثبتت كفاءتها في الاستخلاص والحصول على تركيز وكمية مناسبة من الـ DNA لاستخدامها في تقنية التفاعل التضاعفي (PCR) لسلسلة الـ DNA اذ تعد طرائق سريعة وبسيطة وموثوقة لاستخلاص الـ DNA .

استخدمت تقنية التشخيص الجزيئي Molecular diagnosis لطفيلي *Babesia spp* والنوعين *B.bovis* و*B.bigemina* في كل من دم الأبقار وإناث القراد المحتقنة والمتغذية طبيعيا على الأبقار وتعد الدراسة الاولى التي اجريت في مدينة الموصل إذ أُكد تشخيص جنس *Babesia spp* والنوعين *B.bovis* و*B.bigemina* في عينات الـ DNA المستخلصة من كل من دم الأبقار واناث قراد *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* واناث قراد *Hyalomma anatolicum anatolicum* واناث قراد *Rhipicephalus sanguineus* وذلك باستخدام التفاعل التضاعفي لسلسلة الـ DNA إذ ظهرت نتائج التضاعف على شكل حزم على هلام الاكاروز تركيز ٢٪ وبواقع ناتج تفاعل ٦٤٤ و٣٥٠ و٢٧٨ زوجا قاعديا (bp) على التوالي .

University of Mosul
College of Veterinary medicine

Morphological and molecular study of *Babesia spp* and isolation and diagnosis of tick vector in infected cattle in Mosul city

Eman Ghanim Suleiman

Ph.D. Thesis

Veterinary Medicine / Veterinary Parasites

Supervised By
Professor
Dr. Ahlam Fathi Al-Taiee

2018 A.D **1439 A.H**

Abstract

The current study included examination of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in 300 blood smears stained with 5%of Giemsa stain which were colleted from cattle in Mosul city from both sexes with different ages during the period from March 2014 to the end of May 2014, the total percentage of *Babesia spp* infection was (42.33%) and the percentage of *B.bovis* and *B.bigemina* (30.66%) and (24.33%) respectively .The blood smears which were stained with Giemsa stain contain 0.5% Triton X-100 appeared cleaner and easily recognized the blood cells and parasites. High percentage of infection was appeared with single infection with *B.bovis* was (42.51%) followed by double infection with *B.bovis* and *B.bigemina* and single infection with *B.bigemina* was (29.92%) and (27.55%) .The results of this study revealed no significant differences in the percentage of infection between males and females of cattle and different groups of ages at the significant level $p<0.05$ .. The current study included the possibility using fluorescent Acridine Orange stain in the diagnosing of *Babesia spp* in (50) blood samples of cattle which collected during the period from October to the November 2017 cattle in Mosul city/Iraq . This dye is easily applied and takes no more than 2-5 minutes to diagnose of *Babesia spp* using of fluorescent microscope versus 45 minutes of Giemsa stain by using light microscope. The benefit of Acridine orange stain is in its uses in epidemiological and survey studies and for the control programs against Babesiosis. The result of this study also showed that the total percentage of infestation with hard ticks was (29.66%), and diagnosed the *Hyalomma anatolicum anatolicum ,Rhipicephalus sanguineus sanguineus ,* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus . Rhipicephalus (Boophilus) microplus* was the common species (49%) and recorded for the first time in Mosul city . Infestation with one species of hard ticks formed the highest percentage was (41%) while the

percentage of infestation with more than two species and two species of ticks were (33%) ,(26%) respectively . There were no significant differences in the percentage of infestation with ticks between males and females of cattle at $p<0.05$ and the high percentage of infection was recorded in animals aged 3-5 years was (58.62%), while the lower percentage of infestation with ticks recorded in animals aged 1- >3years was (19.68%). The highest percentage presence of ticks on the body of cattle appeared in the backward legs was (38.2%) and udder was (38.2%) while the lower percentage appeared in the back and neck was 5.61% .The high percentage of infection with *B.bovis and B.bigemina* appeared in animals coming to the teaching hospital of the college of veterinary medicine\university of Mosul was (74.04%) while the lower percentage of infection appeared in animals slaughtered in Mosul abattoir was (34.78%) . The high percentage of infestation with ticks recorded in animals in farms of college of agriculture and forestry\ university of Mosul was (68.57%) while the lower percentage of infestation appeared in animals slaughtered in Mosul abattoir was (7.24%) .Through the examination of the hemolymph of engorged females ticks which remained lived 5-8days under conditions of laboratory showed the possibility diagnosis vermicules of *Babesia spp* in female of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus ,Hyalomma amatolicum anatolicum and Rhipicephalus sanguineus* with percentages were (48.43%) ,(20%) ,(41.66*%)* respectively, developmental stages(ring stages ,round dark bodies and shizonts) were diagnosed in all females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ,10 of females of *H.anatolicum anatolicum* and 7 females of *Rhipicephalus sanguineus sanguineus with percentages* were (100%) ,(33.33%) (58.33%) respectively.

The results of current study revealed the presence of direct correlation between the percentage of parasitemia of *Babesia spp* in the blood of cattle and the number of vermicules in the hemolymph of female of hard ticks and in

this study no significant presence in the number and percentage of adult female ticks which infected with vermicules which were collected from different groups of ages of animals at $p < 0.05$.

The alternative methods (not commercial) which used for extraction of DNA from the blood of cattle and engorged females ticks were evaluated as ,most efficient and obtained good concentration and purity of DNA which used in polymerase chain reaction and these methods characterized as most rapid ,simple and dependable methods. The molecular diagnosis of *Babesia spp* ,*B.bovis* and *B.bigemina* in the blood of cattle and engorged females of hard tick which naturally feeding on cattle was considered the first study which conducted in Mosul city and averment the diagnosis of *Babesia spp* ,*B.bovis* and *B.bigemina* in DNA samples which were extracted from blood of cattle and females of *Rhipicephalus*(*Boophilus) microplus , Hyaomma anatolicum anatolicum and Rhipicephalus sanguieus sanguineus* by using polymerase chain reaction ,the results showed product of amplification on agarose gel (2% 644) bp ,350bp and 278bp respectively .