جامعة الموصل

كلية الطب البيطري

# التشخيص التقليدي والجزيئي لبعض أنواع الأوالي في الأسماك في مدينة الموصل

اسراء عبد الواحد فتحي حسن الطائي

رسالة ماجستير

الطب البيطري / الطفيليات البيطريّة

إشراف

الأستاذ الدكتورة

نادية سلطان الحيالي

ربيع الثاني/ 1446 هـ

تشرين الأول/ 2024 م

# الخلاصة

جمعت 200 سمكة حيَّة من الأسواق المحلية 56 من نوع الشبوط، 54 من نوع الكارب الاعتيادي، 35 من نوع البني، 30 من نوع البلعوط الملكي (الزولي) و25 من نوع الكطان من مدينة الموصل وبواقع 2-3 زيارة، بمعدل 6-9 أسماك أُسبوعيًا للمدة من شهر آب 2023 إلى شهر شباط 2024. تم أخذ قشطات خارجية من الجلد والغلاصم والزعانف، أظهرت نتائج الفحص المجهري للأوالي الخارجية بالقشطات الرطبة وبالاعتماد على الصفات الشكلية؛ إذ ظهر طفيلي *Trichodina spp.* بأشكال كمثريه أو مستديرة حسب نوع الطفيلي، حاوي على العديد من الفجوات الغذائية وكذلك على نواتين، وبلون ذهبي إلى بني، ويتميز بوجود الأهداب التي تحيط بالسطح الخارجي للطفيل. يتراوح قطره ما بين 37-60 ميكروميتر. وحاوي على قرص التثبيت (Adhesive disc) الَّذي يحتوي هذا القرص أيضًا على تراكيب هيكلية معقدة بشكل ثلاث حلقات متمركزة مع بعضها، الحلقة الخارجية منها تكون بارزة جدًا تدعى بالحلقة المسننة (Denticulate ring) في حين ظهر طفيلي *Ichthyophthirius spp.* بالقشطات الرطبة بشكل كمثري وبحجم يتراوح من 0.03 إلى 1 ملم. ويتميز بوجود نواتين بداخله إحداهما كبيرة الشكل على شكل حدوة حصان والأُخرى دائرية. وظهر طفيلي *Chillodenella spp.* في القشطات الرطبة من الغلاصم للأسماك الخمجة على شكل ورقة بيضاوية ومسطحة ظهرياً بطنياً، يحتوي على نواة كبيرة، السيتوبلازم محبب ويحتوي على العديد من الفجوات الصغيرة فضلًا عن فجوتين متقلصتين مهدب؛ يتراوح حجم الطفيلي 50-70×30-40 ميكروميتر. وكشفت الدراسة ولأول مرة طفيلي *Piscinoodinium spp.* في القشطات الرطبة من الغلاصم والجلد؛ إذ لوحظ العديد من مرحلة الناشطة بأشكال كمثريه أو مستديرة وبأحجام مختلفة، بلون ذهبي إلى بني، ولوحظ المئات من الطفيلي على شكل مستعمرات باستِعمال المجهر التشريحي، إذ تفاوتت أماكن وجود الطفيليات الخارجية؛ إذ عزل طفيلي الـ *Trichodina spp.* من الجلد والغلاصم والزعانف في حين عزل طفيلي الـ *Ichthyophthirius spp.* من الجلد والزعانف، أمَّا كل من *Chillodenella spp.* و *Piscinoodinium spp.* فكانت أماكن وجودهم في الجلد والغلاصم.

بيَّنت نتائج الدراسة أنَّ الأسماك خمجة بأربعة أنواع من الأوالي الخارجية وهي *Trichodina spp., Ichthyophthirius spp., Piscinoodinium spp., Chillodenella spp.*؛ إذ بلغت أعلى نسبة خمج بطفيلي *Trichodina spp.* 19.5% ومع فرق معنوي وتلتها *Chillodenella spp.* و *Ichthyophthirius spp.* وبنسب 7.5% و6.5% على التوالي وأقلَّها بطفيلي *Piscinoodinium spp.* وبنسبة خمج 3%.

لم تسجل الدراسة الحالية فروق معنوية دالة إحصائيًا بين نسب الخمج في أوالي الطفيليات الخارجية خلال أشهر آب إلى شباط عند $P\geq0.05$ اذ تراوحت نسب الإصابة بين 32.43% و14.28%؛ إذ بلغت أعلى نسبة خمج في شهر آب وبنسبة بلغت 32.43% وأقلّها في شهر شباط وبنسبة خمج بلغت 14.28%.

أثبتت نتائج الدراسة الجزيئية باستِعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للكشف عن طفيلي *Trichodina spp.* بتضخيم الجين *SSUrDNA* وبناتج تفاعل بحجم 1700 زوج قاعدي وأثبتت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل للتحري عن طفيلي *Ichthyophthirius spp.* وبحجم ناتج 1700 زوج قاعدي. أكدت نتائج تعاقب الجينات لتفاعل البلمرة المتسلسل في عينات الجلد والغلاصم والزعانف للأسماك الخمجة بالاوالي الخارجية موجبة لطفيلي *Trichodina spp.* وتم تسجيل العزلة الموجبة في (NCBI) تحت الرقم التسلسلي PQ012982 وعزلة لطفيلي *Ichthyophthirius spp.* تحت الرقم التسلسلي PQ012981 تعود للنوع *Ichthyophthirius spp.* وفقا لتحليل الشجرة الجينية لكلا الطفيليين.

وشُخِّص مجهريًا عن طريق عمل مسحات دقيقة من قشط المعدة والأمعاء وصبغها بصبغة كيمزا واللوكال ايودين وطريقة الطفو باستِعمال محلول السكر المشبع. أظهرت النتائج أنَّ الأسماك خمجة بأربعة أنواع من الأوالي الداخلية *Cryptosporidium spp.* و*Eimeria spp.* و*Entamoeba spp.* و*Giardia spp.* كانت أعلى نسبة إصابة بـ *Cryptosporidium spp.* و*Eimeria spp.* 26.5% و21.5% على التوالي. بينما كان معدل الإصابة أقل مع *Giardia spp.* و*Entamoeba spp.* 3.5% و1% على التوالي. تراوحت معدلات الإصابة للأشهر بين 34.28% و14.28% وكان أعلى معدل في تشرين الأوَّل 34.28% وأدنى معدل في شباط 14.28% مع عدم وجود فروق معنوية عند $P\geq0.05$ مجهريا ظهرت أكياس بيض طفيلي الأبواغ الخبيئة بأشكال كروية أو بيضاوية بأحجام من 4.6-5.5×3.8-4.7 ميكروميتر. في حين ظهرت أكياس بيض الإيميريا كروية إلى بيضاوية بحجم 12-19 ميكروميتر. أمَّا الطفيلي *Entamoeba spp.* فيكون كروي الشكل بحجم من 10-18 ميكروميتر، في حين ظهرت أكياس طفيلي الجيارديا بشكل بيضاوي يحتوي على أربع نوى محاطة بجدار واقي 8-12 ميكروميتر. يرجع وجود الأوالي المعوية في أنواع الأسماك المفحوصة إلى عمر أنواع الأسماك وتلوث المياه وهي الدراسة الأولى للكشف عن الأوالي المعوية في أنواع الأسماك في الموصل، العراق.

أظهرت قشطات من المعدة والأمعاء المصبوغة بصبغة الزيل- نيلسن (ZN) أكياس البيض إضافة لطفيلي الابواغ الخبيئة بأشكال كروية أو بيضاوية وبحجم يتراوح من 4.6-5.5 × 3.8-4.7 ميكروميتر. أظهر تفاعل البلمرة المتسلسل وتحليل تتابع التسلسل الجيني لأربع عزلات

University of Mosul
College of Veterinary Medicine

# Traditional and Molecular Diagnosis of Some Protozoa in Fish in Mosul City

**Israa Abdulwahed Fathe Hasan Altaie**

**MSc/Thesis**

**Veterinary Medicine / Veterinary Parasitology**

**Supervised by**

**Professor**

**Dr. Nadia Sultan Alhayali**

**2024 A.D** **1446 A.H**

# Abstract

A total of 200 fresh fish of five species 56 *Arabibarbus grypus*, 54 *Cyprinus carpio*, 35 *Mesopotamichthys sharpeyi*, 30 *Chondrostoma regium* and 25 *Luciobarbus xanthopterus* were collected from local markets from Mosul city for the period from August 2023 to February 2024 to detect the infections with ectoparasites and endoparasites. The results of the current study showed that the fish are infected with four types of external protozoa, *Trichodina spp.*, *Ichthyophthirius spp.*, *Piscinoodinium spp.* and *Chillodenella spp.*, where the highest incidence in *Trichodina spp.* parasite reached 19.5% with a significant difference, followed by *Chillodenella spp.* and *Ichthyophthirius spp.* 7.5%, 6.5% respectively, and the lowest with the parasite *Piscinoodinium spp.* with an infection rate of 3%. There were no significant differences in the infection rates between endoparasites and ectoparasites during the months of August to February at $P \leq 0.05$. The infection rates ranged between 32.43% and 14.28%, where the highest rate of infection was in August 32.43%, and the lowest in February14.28%. The study showed that by external scraping from skin, gills and fins, where the locations of the external parasites varied, where the *Trichodina spp.* parasite was isolated from the skin, gills and fins, while *Ichthyophthirius spp.* parasite was isolated from the skin and fins, while both *Chillodenella spp.* and *Piscinoodinium spp.* were their places in the skin and gills.

The results of microscopic examination of the external protozoa showed wet scraping and depending on the morphological characters, where *Trichodina spp.* parasite appeared in pear or round shapes depending on the type of parasite, containing many food vacuoles as well as large and small nucleus, and in golden to brown in color, and is characterized by the presence of cilia that surround the outer surface of the parasite. Its diameter

varies between 37-60 µm. It contains the adhesive disc which also contains complex structures in the form of three rings positioned together, the outer ring of which is very prominent called the denticulate ring. While the parasite *Ichthyophthirius spp.* appeared with wet scrape as pear-shaped and ranging from 0.03 to 1 mm. It is characterized by the presence of two nuclei inside, one of which is large in shape in the form of a horseshoe and the other is circular. The *Chillodenella spp.* parasite appeared the wet mount of fish in the form of an oval leaf and flat dorsally ventrally, containing a large nucleus, granular cytoplasm and many small gaps in addition to two ciliated vacuoles. The size of the parasite ranges from 50-70 x 30-40 µm. The study revealed for the first time the parasite *Piscinoodinium spp.* in the wet mount of skin where many active phases were observed in pear or round shapes and in different sizes, golden to brown in color, and hundreds of the parasite were observed in the form of colonies using anatomical microscopy.

The results of the molecular study using polymerase chain reaction (PCR) technique to detect the parasite *Trichodina spp.* by amplifying the *SSUrDNA* gene and a reaction product of 1700 bp while the results of the PCR for the investigation of the parasite *Ichthyophthirius spp.* were also proven with product 1700 bp.

Results of gene sequencing analysis for skin, gills and fin samples of were confirmed positive for *Trichodina spp.* under accession number PQ012982 and isolate of *Ichthyophthirius spp.* under the accession number PQ012981 belongs to the species *Ichthyophthirius spp.* according to the analysis of the genetic tree of both parasites.

Microscopic examination was carried by scraping smears from the stomach and intestine stained by Giemsa, Lugal iodine and floatation method with saturated sugar solution. Results revealed that fish were infected with four species of internal protozoa, *Cryptosporidium spp.*,

*Eimeria spp.*, *Entamoeba spp.* and *Giardia spp.* The highest incidence of *Cryptosporidium spp*. and *Eimeria spp.* were 26.5% and 21.5% respectively. While the incidence rate was lower with *Giardia spp.* and *Entamoeba spp.* 3.5% and 1% respectively with no significant differences between them. The infection rates for months ranged between 34.28% and 14.28%, the highest rate was in October 34.28% and the lowest in February 14.28% with no significant differences at $P \leq 0.05$. Morphological characteristics of *Cryptosporidium spp.* oocysts appeared spheroidal or ovoidal with diameter ranged from 4.6-5.5 X 3.8-4.7µm. The oocysts of *Eimeria spp.* are spherical to ovoid 12-19 µm in size. The parasite *Entamoeba spp.* cysts are spherical 10 to 18 µm., while cysts of *Giardia spp.* parasite appeared as oval containing four nuclei surrounded by a protective wall and about 8-12 µm. Presence of intestinal protozoa in fish species is due to age factor and water contamination. This is the first report concerning prevalence of intestinal protozoa in fish species in Mosul, Iraq. Nested PCR and sequence analysis of four samples using *18SrRNA* gene showed positive for both zoonotic species *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* under accession numbers PP593584 of *Cryptosporidium parvum* and three isolates PP593585, PP593586 and PP593587 for *Cryptosporidium hominis* were 100% identical to the same species in other studies in Iraq and other countries according to blast in GenBank of NCBI.