جامعة الموصل
كلية العلوم

دراسة وبائية وجزيئية لتشخيص طفيلي البويغيات الخبيئة *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 سيناء عبدالله علي الجرجري

1438هـ **2017م**

المستخلص بلغة الرسالة

تضمنت هذه الدراسة الكشف عن انتشار داء البويغات الخبيئة 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 إلتهابات في المعدة والأمعاء , حيث تم الكشف باستخدام طريقة التصبيغ بصبغة الزيل نلسن المحورة Modified Zeil- Neelsen stain وصبغتي الملاكايت الخضراءMalachite 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 أُجري فيها البحث) , حيث أظهرت النتائج أن نسبةالإصابة الكلية بداء البويغات الخبيئة 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% لكِلا الجنسين وبنسبة 39.13% للأطفال بعمر(3 سنوات - 7 سنوات) لكِلا الجنسين , حيث سُجلت إصابة واحدة بين الإناث بعمر 7 سنوات وبنسبة 2.5% حيث كان عدد الإصابات يتناقص بتزايد العمر لذلك لم يتم تسجيل أي اصابة 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 فرقاً معنويا بين النسبتين. كما بيّنت النتائج حدوث أعلى نسبة إصابة 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 وبفارق معنوي ($P < 0.05$) .

تم إجراء دراسة جزيئية للكشف عن وجود أكياس بيض طفيلي البويغات الخبيئة 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 الثلاجة 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 علىAmplicon بحجم ~1325 قاعدة نتروجينية .

تم تحليل تسلسل الحمض النووي لثلاث عينات مختارة من نواتج تفاعل البلمرة والتي أظهرت نتيجة موجبة للمنطقة المستهدفة من الحمض النووي لطفيلي البويغات الخبيئة لمعرفة مدى تطابق تسلسل الحمض النووي للنواتج مع التسلسل الرئيسي للحمض النووي للطفيلي *Cryptosporidium* reference gene , حيث تمت عملية تنقية العيّنات وقراءة تسلسل الحمض النووي في شركة GeNet Bio في كوريا الجنوبية.

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