جامعة الموصل

كلية الطب البيطري

مقارنة بعض الطرائق التقليديَّةٌ والتشخيص الجزيئي لأنواع طفيليّ الحويصلاتِ الصُّنوبريَّة في الضَّأْنُ والمَعْزِ في محافظةِ ميسانَ – العراقِ

رواء غانم محمد إبراهيم

أُطروحة دكتوراه

الطب البيطري / الطفيليات البيطرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة
منال حمادي حسن

الأستاذ المساعد الدكتور
ميثم عبد الكاظم دراغ

1444هـ

2023م

الخلاصة:

أُجريت الدراسة الحالية في محافظة ميسان للكشف عن طفيلي الحويصلات الصُّنوبريَّة (*Sarcocystis* spp.) بالطريقتين التقليدية والجزيئية لتشـــخيص أنواع هذا الجنس في كل من الضَّأْنُ والمعز بوصفهما مضيفين وسطيين لأنواع متعددة من هذا الطفيلي فضلًا عن دراسة العوامل المتعلقة بالخمج بالطفيلي الَّتي تمثلت بفصول السنة والجنس والعمر لهذين النوعين من المجترات الصغيرة.

بدات الدراســة من كانون الثاني ولغاية كانون الأَوَّل 2020 تم خلالها فحص عينات من عضلات المرئ والحجاب الحاجز والقلب واللسان لكل واحد من 300 من الضَّأْنُ و 200 من المعز وفُحصِت بالطرائق التقليدية والنسجية والجزيئية.

اظهرت نتائج الدراسة التقليدية ان نسب الخمج بالنوع العياني من طفيلي الحويصلات الصُّنوبريَّة منخفضة ومسجلة 2.33% و 2% في عينات المرئ فقط في الضَّأْنُ والمعز على التوالي، تراوحت أَحجام أكياس الطفيلي العيانية بين 1-10 ملم في الطول و 2-6 ملم في العرض. تفاوتت نسب أخماج المرئ بالنوع العياني على وفق فصول السنة في الضَّأْنُ والمعز؛ إذ كانت أعلى نسب الخمج بالنوع العياني في الضَّأْنُ في فصل االشتاء مسجلة 5.33% تلتها نسبتا الخمج في فصلي الربيع والخريف اللتان بلغتا 2.63% و 1.35% على الترتيب. في حين لم تسجل أَي حالة أخماج من النوع العياني في فصل الصيف، أَمَّا في المعز فقد سجل أعلى نسبة أخماج بالنوع العياني في فصل الشتاء الَّتي بلغت 5.76% تلتها نسبة الخمج في فصل الربيع 1.92% ولم تسجل اية حالة أخماج في فصلي الصيف والخريف.

اظهرت النتائج ارتفاع نسبة الخمج في الاناث في الضــان والمعزاذ بلغت في الضــان 3.75% وفي المعز 2.85% وسجلت نسبة خمج في الذكور في الضان بلغت 1% ولم تسجل اي حالة في المعز،كمالوحظ تناسبا طرديا في الأخماج العيانية مع العمر في الضــان والمعز.اذ سجلت نسبة خمج في الاعمار الاكثر من سنة في الضان 3.68% والمعز3.2% ولم تسجل اي خمج في الاعمار الاقل من سنة في كلا النوعين من الحيوانات .

ســجل الخمج بالنوع المجهري من الطفيلي نسـباً مرتفعة بلغت 96.66% و 90% في الضَّأْنُ والمعزعلى التوالي. تباينت ابعاد الاكياس المجهرية في دراستنا اذ ظهرت باحجام اكبر في المري وبمعدل بلغ 235.8×45.61 مايكرومترفي الضــان و133.3×37.4 مايكرومتر في المعز وباقل حجم في القلب وبمعدل 71×31.8 و87.8×18 في الضان والمعز على التوالي.

ووجدت دراستنا أن نسب الخمج بالنوع المجهري كانت مرتفعة في كل فصول السنة؛ إذ تراوحت نسب الخمج بين 98.66%-93.33% في الضَّأْنُ و 94.23%-86% في المعز. أظهرت نتائج دراستنا ارتفاع نسب الخمج بالنوع المجهري مع تقدم العمر في كلا الضَّأْنُ والمعز، وتبين عدم وجود فروق معنوية في نسب الخمج بين الذكور والإناث في كلا النوعين من الحيوانات.توزعت نسب الخمج بالنوع المحهري على وفق الأعضاء. إذ كانت أعلى نسبة أخماج في عضو المرئ 96.7% و 90% تلتها في الحجاب الحاجز 95% و 85% ثم في اللسان 77.66% و 78.5% وأقل نسبتي أخماج سجلت في القلب 63.7% و45% في الضَّأْنُ والمعزعلى التوالي.

اظهرت نتائج المقارنة بين كفاءة الطرائق التقليدية المستخدمة في دراستنا لتشخيص الخمج بالنوع المجهري في كل الأعضاء المفحوصة والمعزولة من الضَّأْنُ والمعز الَّتي تضمنت طريقة الهضم بالببسين وطريقة العصارة وطريقة منظارالشعريات. أَنَّ طريقة الهضم بالببسين كانت أكثر الطرائق التقليدية كفاءة في تشخيص النوع المجهري من الطفيلي، جاءت بعدها طريقة منظار الشعريات. وسجلت طريقة التشخيص المعتمدة على فحص العصارة أقل الطرائق التقليدية كفاءة في تشخيص الطفيلي مجهرياً.

تناولت الدراسة بالفحص النسجي اعتماد التوصيف المظهري لجدارًالكيس للتمييز بين أنواع جنس طفيلي الحويصلات الصُّنوبريَّة نسجيًا في العينات العيانية والمجهرية في الضَّأْنُ والمعز بصبغ مقاطع نسجية من الأعضاء الأربعة قيد الدراسة بصبغة الهيماتوكسلين والأيوسين (H&E)، وصبغة حامض البريوديك (PAS). وتبين خلال الفحص النسجي تشخيص النوع العياني *S. gigantea* في كلا الضَّأْنُ والمعز الَّذي تميز بوجود جدارين الخارجي منهما يمثل جدارًا ثانويًا (SW) (Secondary wall) وبسمك 2.5-4 مايكرومتر والداخلي يمثل جدارًا ابتدائيا (PW) (Primary wall) بسمك 1.2-2.5 مايكرومترحاوي على بروزات ومستمر إلى تجويف الكيس بوساطة حواجز ممتدة تفصله إلى غرف متداخلة حاوية على الحوينات بداخلها. فضلًا عن ذلك فقد شخص نسجيًا نوعان من الأكياس المجهرية في الضَّأْنُ هما النوع *Sarcocystis tenella* الَّذي يمتاز بجدران سميكة مخطط شعاعيًا مع بروزات تشبه الزغابات المتداخلة مع بعضها بكثافة عالية. والنوع *Sarcocystis arieticanis* الذي ظهرت أكياسه نحيفة الجدار بسمك 0.8 مايكرومتر. في حين شخص نوع واحد فقط في المعز وهو *Sarcocystis capracanis* الَّذي اتصفت أكياسه بجدار سميكة مع وجود خطوط شعاعية ونتوءات زغبية تشبه الأصابع متفاوتة في السمك.

اشتملت الدراسة الجزيئية لطفيلي الحويصلات الصُّنوبريَّة على التشخيص الجزيئي لهوية الطفيلي على مستوى النوع وذلك بالتضخيم الجيني باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) للجزء المستهدف من الدنا المستخلص من عينات الطفيلي للضان والمعز لاثنين من الجينات هما (*18S rRNA Gene*) و (*COX1 Gene*) وبواقع 160 عينة مجهرية و 7 عينات عيانية للضان، فضلًا عن 120 عينة مجهرية و 4 عينات عيانية للمعز.

أظهرت 90.41% و 87.9% من عينات الضَّأْنُ والمعز على التوالي أخماج موجبة مع الجين (*18S rRNA Gene*)؛ سجلت فيها 100% من عينات المرئ العيانية منها والمجهرية ولكلا الحيوانين أخماج موجبة أَمَّانسب الخمج لعينات الحجاب الحاجز واللسان والقلب فقد سجلت 92.5% و 85% و 82.5% على التوالي في الضَّأْنُ و 90% و 86.7 و 80% على الترتيب في المعز. من جهة أُخرى فقد سجل 97% و 96.77% من عينات الضَّأْنُ والمعزعلى الترتيب أخماج موجبة مع الجين (*COX1 Gene*) ، سجلت فيها جميع عينات المرئ العيانية منها والمجهرية ولكلا الحيوانين أخماج موجبة، اما نسب الخمج لعينات الحجاب الحاجز واللسان والقلب فقد بلغت 97.5% و 95% و 95% على التعاقب في الضَّأْنُ و 96.7% و96.7% و 96% على الترتيب في المعز.

بينت نتائج تحليل تسلسل النيوكليوتيدات للجين (*18S rRNA Gene*) للعينات العشر المدروسة عن طريق NCBI-BLAST Nucleotide Alignment أن العينتين المجهريتين الضان (OP296912.1 و OP474006.1) كانتا مطابقتين للنوع *S. tenella* الألماني ذي الرقم العالمي (L24383.1) وبنسبة تطابق بلغت 99.63 % و 99.50% على التعاقب. أَمَّا العينتان العيانيتان للضان (OP474009.1 و OP474015.1) فقد أظهرت كلا العينتين نسبة تطابق بلغت 99.75 مع النوع *S. gigantea* الإيراني ذي الرقم العالمي(KP053892.1). من جهة أُخرى فقد تطابقت العينات المجهرية الأربع للمعز(OP474017.1 و OP474018.1 و OP476699.1 و OP474036.1) مع النوع *S. capracanis* الماليزي ذي الرقم العالمي (KR155191.1) وبنسب تطابق بلغت 99.50% و 99.01% و99.76 % و 99.13 % على الترتيب. وأخيرًا تماثلت العينتان العيانيتان للمعز (OP474061.1 وOP474062.1) مع النوع *S. buffalonis* المصري ذي الرقمين العالميين (KU247913.1) و(KU247913.1) وبنسبة تطابق 84.39% و 85.64%. وبذا تعد دراستنا الأَوَّلى محليًا وعالميًا في تشخيص النوع *S. buffalonis* في المعز، وبيَّنت نتائج تحليل شجرة العلاقة التطورية بين الأنواع المذكورة آنفًا وجود علاقات تطورية وبدرجات متفاوتة بين هذه الأنواع. إذ إنَّ اوثق العلاقات

ظـهـرت بـيـن الأزواج (OP474017.1 و OP474018.1) وبـيـن (OP296912.1 و OP474006.1) وبين (OP474061.1 و OP474062.1) ثم بين (OP476699.1 و OP474036.1). وأظهرت العزلات(OP474017.1 و OP474018.1 و OP476699.1 و OP474036.1) قرابة فيما بينها بدرجات أكبر من باقي العزلات.

فيما أظهرت نتائج تحليل تسلسل النيوكليوتيدات للجين (*COX1 Gene*) للعينات الثمان المـدروســـة أنَّ العينتين المجهريتين للضـــان (CO1) و (CO2) تطـابقتـا مع النوع *S. arieticanis* الإسـبانيّ ذي الرقم العالمي (MK419975.1) وبنسـبة تطابق بلغت 97.70 % و 97.47 % على التعاقب، فيما كانت العينات الأربع العيانية الضـــان (CO3 و (CO4) و (CO5 و (CO6) متطـابقـة مع النوع *S. gigantea* النرويجي ذي الرقم العـالمي (KC209601.1) وبنسبة تطابق بلغت 99.64 % و 99.27 % على الترتيب. من جهة أُخرى فقد تطابقت العينتان العيانيتان للمعز(CO7) و (CO8) مع النوع *S. gigantea* الإســبانيّ ذي الرقم العـالمي (MK420011.1) وبنســـب تطـابق بلغـت 99.64 % و 99.27 % وعلى الترتيب. وعند تحليل شـــجرة العلاقة التطورية بين الأنواع آنفًا لوحظ وجود علاقات تطوريَّـة وبـدرجـات مختلفـة بين هـذه الأنواع، وكـانـت أوثق العلاقـات بين الأزواج (CO3 و (CO4) و (CO1) و (CO2).

University of Mosul

College of Veterinary Medicine

Comparison of Some Conventional Methods and Molecular Diagnosis of *Sarcocystis* spp. in Sheep and Goats in Misan Governorate-Iraq

Rawaa Ghanim Mohammed

Ph.D. / Dissertation

Veterinary Medicine / Veterinary Parasitology

Supervised by

Prof. Dr. **Manal Himmadi Hasan**

Assist Prof. Dr. **Maytham Abdul-Kadhim Dragh**

2023 A.D. **1444 A.H.**

Abstract

The current study was conducted in Misan Governorate to detect the parasite *Sarcocystis* spp. by both conventional and molecular methods and to identify the species of this genus in both sheep and goats as intermediate hosts for multiple species of this parasite, As well as this study was identified factors related to parasite infection, which were represented by the seasons, sex and age, of these two types of small ruminants.

The study extended for the period from January to December 2020, during which samples of the muscles of the esophagus, diaphragm, heart and tongue were examined for each of 300 sheep and 200 goats using conventional, histological and molecular method.

Regarding to the traditional study, the rates of infection with the macroscopic type of *Sarcocystis* spp. was low and recorded 2.33% and 2% in esophageal samples only in sheep and goats, respectively. The sizes of macroscopic parasite cysts was ranged between 1-10 mm in length and 2-6 mm in width.

The rates of macroscopic esophageal infection varied according to the seasons of the year in sheep and goats; The highest rates of macroscopic infection was recorded in sheep in the Winter season 5.33%, followed by the two infection rates in the Spring and Autumn seasons, which reached to 2.63% and 1.35%, respectively. While no case of infection with macroscopic type was recorded in the Summer. In goats, the highest incidence of macroscopic infection was recorded in the Winter season, which reached to 5.76%, followed by the infection rate in the spring season of 1.92%, and no case of infection was recorded in the Summer and Autumn seasons. The results showed a high rate of infection in females in sheep and goats, it reached 3.75% in sheep and 2.85% in goats, and the rate of infection in males in sheep amounted to 1%, and no cases were recorded

in goats. The rate of infection at ages more than one year in sheep was 3.68% and goats 3.2%, and no infection was recorded at ages less than one year in both types of animals.

Infection with the microscopic type of parasite was recorded as high as rates 96.66% and 90% in sheep and goats, respectively.

The dimensions of the microscopic cysts varied in our study, as they appeared in larger sizes in the esophagus, with an average of 235.8×45.61 micrometers in sheep and 133.3×37.4 micrometers in goats, and the smallest size in the heart, with an average of 71×31.8 and 87.8×18 in sheep and goats, respectively.

Our study found that the rate of infection with the microscopic type was high in all seasons of the year; The infection rate was ranged between 98.66% and 93.33% in sheep and 94.23% and 86% in goats. The results showed an increase in the rates of infection by the microscopic type with advancing age in both sheep and goats, and it was found that there were no significant differences in the rates of infection between males and females in both types of animals.

The rate of infection was distributed according to the type of organs. The highest incidence of infection was in the esophagus 96.7% and 90.5%, followed by the diaphragm 95% and 85%, then the tongue 77.66% and 78.5%, and the lowest rate was recorded in the heart 63.7% and 45% in sheep and goats, respectively.

The dimensions of the microscopic cysts varied in our study, as they appeared in larger sizes in the esophagus, with an average of 235.8×45.61 micrometers in sheep and 133.3×37.4 micrometers in goats, and the smallest size in the heart, with an average of 71×31.8 and 87.8×18 in sheep and goats, respectively.

When comparing the efficiency of the traditional methods used in our study to diagnose the infection of the microscopic type in all the examined

organs isolated from sheep and goats, It was found that the method of digestion with pepsin was the most efficient traditional method for diagnosis of parasite, followed by the trichinoscopy. While the squeezing method was recorded as the lowest efficient traditional method for diagnosing *Sarcocystis* spp. microscopically.

The results of the current study showed that the incidence of both macroscopic and microscopic types increased with age in both sheep and goats. It was found that there were no significant differences in infection rates between males and females in both types of animals.

The study dealt with the histological examination adopting the phenotypic characterization of the cyst wall to distinguish between the species of the genus Sarcocystis histologically in the macroscopic and microscopic samples of sheep and goats by staining tissue sections of the four organs under study with hematoxylin and eosin (H&E), and periodic acid (PAS) stain.

The macroscopic species, *S. gigantea,* was diagnosed in both sheep and goats, which was characterized by the presence of two outer walls representing a secondary wall (SW) with a thickness of 2.5-4 µm and the inner representing a primary wall (PW) with a thickness of 1.2-2.5 µm, containing protrusions and continuing into the cavity of the cyst by means of extended septa which separating it into overlapping rooms containing the bradyzoites inside. In addition, two types of microscopic cysts were identified histologically in sheep, *Sarcocystis tenella*, which is characterized by thick, radially streaked walls with villi-like projections intertwined with each other in high density. *Sarcocystis arieticanis*, whose cysts are thin-walled, 0.8 micrometers thick. Whereas, only one species in goats, *Sarcocystis capracanis*, was characterized by thick-walled cysts with radial streaks and fuzzy finger-like protrusions of varying thickness.

The molecular study of *Sarcocystis* spp. was conducted a molecular using polymerase chain reaction (PCR) of the target segment of DNA extracted from the parasite samples of sheep and goats for two genes, namely (*18S rRNA Gene*) and (*COX1 Gene*). And by 160 microscopic samples and 7 macroscopic samples for sheep, as well as 120 microscopic samples and 4 macroscopic samples for goats.

90.41% and 87.9% of sheep and goat samples, respectively, showed positive infection with the *18S rRNA Gene*; In which 100% of the macroscopic and microscopic samples of the esophagus were recorded, and both animals had a positive infection, while the infection rates for the diaphragm, tongue and heart samples were recorded as 92.5%, 85% and 82.5%, respectively, in sheep, and 90%, 86.7 and 80%, respectively, in goats. On the other hand, 97% and 96.77% of sheep and goats samples, respectively were recorded a positive infection with the *COX1 Gene*; In which all macroscopic and microscopic esophageal samples were recorded and both animals had a positive infection in sheep. The infection rate for the diaphragm, tongue and heart samples was 97.5%, 95% and 95%, respectively, in sheep, and 96.7%, 96.7%, and 96%, respectively, in goats.

The results of the nucleotide sequence analysis of *18S rRNA Gene* for the ten studied samples, by NCBI-BLAST Nucleotide Alignment, showed that the two microscopic samples of sheep (OP296912.1 and OP474006.1) were simmilared to the German *S. tenella* species with accession number (L24383.1) with a similarity ratio of 99.63% and 99.50%, respectively. As for the two macroscopic samples of sheep (OP474009.1 and OP474015.1), both samples were showed an identical percentage of 99.75 with the Iranian species *S. gigantea* with accession number (KP053892.1). On the other hand, the four microscopic samples of goats (OP474017.1, OP474018.1, OP476699.1 and OP474036.1) were similar with the Malaysian species *S. arieticanis* with accession number

(KR155191.1) with identical percentages of 99.50%, 99.01%, 99.76% and 99.13%, respectively. Finally, the two macroscopic samples of goats (OP474061.1 and OP474062.1) were similared with the Egyptian species *S. buffalonis* with two accession numbers (KU247913.1) and (KU247913.1), with a matching rate of 84.39% and 85.64%. Thus, our study is the first locally and globally in the diagnosis and interestigly of *S. buffalonis* in goats. The results of the phylogenetic tree analysis also showed the evolutionary relations between the above species exist in varying degrees of evolutionary relations between these species, as the closest relations appeared between the pairs (OP474017.1 and OP474018.1 and between OP296912.1 and OP474006.1) then between OP474061.1 and OP474062.1 and between OP476699.1 and OP474036.1. The isolates (OP474017.1, OP474018.1, OP476699.1 and OP474036.1) showed a relationship between them with greater degrees than the rest of the isolates.

The results of the analysis of the nucleotide sequences of *COX1 Gene* for the eight studied samples showed that the two microscopic samples of sheep (CO1 and CO2) matched with the Spanish species *S. arieticanis* with accession number (MK419975.1) with a matching percentage of 97.70% and 97.47%, respectively. While, the four macroscopic samples of sheep (CO3, CO4, CO5 and CO6) were simllared with the Norwegian species *S. gigantea* with accession number (KC209601.1), with matching rates of 99.64% and 99.27%, respectively. On the other hand, the two macroscopic samples of goats (CO7 and CO8) were similar to the Spanish species *S. gigantea* with accession number (MK420011.1) and matching rates of 99.64% and 99.27%, respectively. When analyzing the phylogenetic tree between the above species, it was showed that there were evolutionary relationships to different degrees Among these species, the most closely related pairs were (CO3 and CO4) and (CO1 and CO2).