



جامعة الموصل
كلية التربية للبنات

تقييم كفاءة بعض الطرق المختبرية الجهرية المناعية والجزيئية في تشخيص طفيل *Cryptosporidium sp*

هبة يونس قاسم يحيى الطائي

رسالة ماجستير
علوم في علوم حياة

بإشراف

المدرس الدكتورة
رنا ابراهيم محمد عبدالله

الأستاذ المساعد الدكتور
فراس محمد بشير الخشاب

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى تشخيص الاصابة بطفيل الابواغ الخبيثة لدى الاطفال الذين يعانون من الاسهال المائي دون الخمس سنوات المراجعين مستشفى ابن الاثير التعليمي باستخدام عدة تقنيات مختبرية تشمل الفحص المجهرى باستخدام طريقتي صبغة الزيل نيلسن المحورة وطريقة التطويف بالمحلول السكري شيدر ، اذ استخدمت هذه الطريقة لتشخيص وعزل اكياس بيض الطفيل فضلاً عن استخدام الفحص المناعي بتقنية ELISA كذلك استخدام تقنية التشخيص الجزيئي المتداخل nested PCR لتأكيد الاصابة بالطفيل.

أظهر الفحص المجهرى للعينات بواسطة صبغة الزيل نيلسن المحورة وجود أكياس البيض للطفيل بنسبة (20.77%) وبواقع (32) عينة موجبة، بينما بلغت نسبة الإصابة (14.28%) (22) عينة مصابة عن طريق الفحص المجهرى بواسطة طريقة التطويف بالمحلول شيدر السكري.

أما بالنسبة للفحص المناعي بتقنية الاليزا فقد كانت نسبة الإصابة بالطفيل (33.76%) وبواقع (52) عينة موجبة من أصل (154) عينة، حيث ظهرت (20) عينة موجبة بالفحص المناعي بينما كانت سالبة في الفحص المجهرى بطريقة صبغة (MZN) ، وكانت نسبة الإصابة بالفحص المناعي هي الأعلى مقارنة مع نسب الإصابة بالفحص المجهرى والجزيئي. اذ أظهر الفحص الجزيئي باستعمال تقنية nested PCR نسبة إصابة (18.75%) (6) عينات موجبة من أصل (32) عينة بالفحص المجهرى بطريقة الصبغة.

وتمت متابعة التسلسل الجيني للعزلات قيد الدراسة من خلال استخدام تقنية DNA Sequencing لتحليل تسلسل العينات والبالغ عددها (3) عينات موجبة حيث تم إرسالها ومطابقة تسلسلاتها الخاصة بالجينات مع تسلسلات الجينات المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحياتية (NCBI) ، حيث سجلت (3) عزلات جديدة (عزلتين تابعتين لطفيل *Cryptosporidium hominis* وعزلة واحدة تابعة لطفيل *Cryptosporidium parvum*)، وقد سجلت العزلات المحلية بأسماء الباحثين في بنك الجينات العالمي وبالأرقام التسلسلية PP669699 و PP669700 العائدة لطفيل *C.hominis* وبالرقم التسلسلي PP669701 العائدة لطفيل *C.parvum* ومن خلال مقارنة مدى ارتباط عينات الدراسة الحالية مع العزلات

العالمية أظهر تحليل المطابقة للعينتين الأولى والثانية العائدة لطفيل *C.hominis* وجود تقارب بنسبة 100% مع العزلة الهندية MW116647 ، في حين بينت النتائج وجود تقارب بنسبة (99.37) مع كل من العزلة الاسترالية MG516758 ، والعزلتين الصينية MK990042 و MG266034 على التوالي والعزلة الاثيوبية KX856000 وعزلات المملكة المتحدة KM085019 و KM012041 كذاك العزلة البرازيلية KP098564 والعزلة الإسبانية KM232682 .

أما بالنسبة للعينة الثالثة العائدة لطفيل *C.parvum* فقد أظهرت النتائج أن العزلة العراقية كانت الأقرب للعزلة الحالية التي سجلت خلال هذه الدراسة حيث أظهرت نسبة تقارب 100% في حين أظهرت النتائج وجود نسبة تقارب 99.84% مع كل من العزلتين العراقيتين والعزلات الإيرانية والعزلة الهندية والعزلة الكورية وعزلتين تابعة للولايات المتحدة الأمريكية .

في حين أظهرت الدراسة تآثر نسبة الإصابة بالعوامل الوبائية إذ سجلت الذكور نسبة إصابة أعلى مقارنة مع الإناث، حيث بلغت نسبة الإصابة 23.80% و 17.14% على التوالي وسجلت الدراسة أعلى نسب إصابة عند الفئة العمرية 5 أشهر - 1 سنة بنسبة 32% كما سجلت نسب الإصابة فرق بحسب أشهر السنة إذ كانت أعلى نسبة إصابة في شهر تشرين الأول بنسبة 32.5% في حين كانت أدنى نسبة إصابة في شهر تموز بنسبة 9.52% فضلاً عن ذلك سجلت الدراسة الحالية نسب إصابة مختلفة بحسب نوع السكن حيث بلغت نسبة الإصابة في الريف 29.68% وفي المدينة بلغت نسبة الإصابة 14.44% .

University of Mosul
College of Education for Girls



**Evaluation of the efficiency of some microscopic,
immunological and molecular laboratory
methods in the diagnosis of *Cryptosporidium sp***

A Thesis submitted

By

Hiba Younus Qasim Yahya Al-Taie

M. Sc. Thesis

Biology

Supervised By

Assistant Prof. Dr.

Lecture. Dr.

Firas Mohammed Bashir

Rana Ibrahim Muhammad

Al-Khashab

Abdullah

2024A.D

1446 A.H

Abstract

The current study aimed to diagnose infection with the *Cryptosporidium* parasite in children suffering from watery diarrhea under the age of five who visited Ibn Al-Atheer Teaching Hospital using several laboratory techniques including microscopic examination using two methods: modified Ziehl-Neelsen stain and the Sheather sugar solution flotation method. This method was used to diagnose and isolate the parasite's oocyst, in addition to using the immunological examination using the ELISA technique, as well as using the nested partial diagnosis technique (nested PCR) to confirm infection with the parasite.

The examination appeared microscopic examination of the samples using the modified Zeihl- Neelsen stains revealed the presence of oocytes of the parasite at a rate of (20.77%) with (32) positive samples, while the infection rate was (14.28%) (22) infected samples through microscopic examination using the sugar sheathe solution flotation method.

But for the immunological examination using ELISA technology, the infection rate with the parasite was (33.76%) , with (52) positive samples out of 154 samples. (20) samples appeared positive in the immunological examination, while they were negative in the microscopic examination using the (MZN) stain method. The infection rate was Immunoassays are the highest compared to infection rates by microscopic and molecular examination.

Where the molecular examination using nested PCR technology shows an infection rate of (18.75%) (6) positive samples out of (32) samples by microscopic examination using the stain method.

The genetic sequence of the isolates under study was followed using DNA Sequencing technology to analyze the sequence of the (3) samples positive that were sent, and their gene sequences were matched with the gene sequences registered at the National Center for Life Technologies Information (NCBI), where they were recorded (3) New isolates (two isolates belonging to the parasite *Cryptosporidium hominis*, and one isolate belonging to the parasite *Cryptosporidium. parvum*), where the local isolates were recorded in the names of researchers at the World Gene Bank and with the serial numbers PP669699 and PP669700 belonging to the parasite *C. hominis* and with the serial number PP669701 belonging to the parasite *C. parvum*, but when comparing the

correlation of the current study's samples with international isolates, the matching analysis of the first and second samples belonging to the *C. hominis* parasite showed a 100% affinity with the Indian isolate MW116647, while the results showed a 99.37% affinity with both the Australian isolate MG516758 and the two Chinese isolates. MK990042 and MG266034, respectively, the Ethiopian isolate KX856000, the United Kingdom isolates KM085019 and KM012041, as well as the Brazilian isolate KP098564 and the Spanish isolate KM232682.

But for the third sample belonging to the *C. parvum* parasite, the results showed that the Iraqi isolate was closest to the current isolate recorded during this study, as it showed a percentage of approximately 100%, while the results showed a percentage of approximately 99.84% with each of the two Iraqi isolates, the Iranian isolates, the Indian isolate, the Korean isolate, and two affiliated isolates. For the United States of America.

While the study showed that the infection rate was affected by epidemiological factors, as males recorded a higher infection rate compared to females, where the infection rate reached 23.80% and 17.14%, respectively, the study recorded the highest infection rates in the age group 5 months - 1 year at 32%, the infection rates were also recorded, there is a difference according to the months of the year, as the highest infection rate was in October at 32.5% while the lowest infection rate was in July at 9.52%. In addition, the current study recorded different infection rates according to the type of residence, as the infection rate in the countryside reached 29.68% and, in the city, the infection rate was 14.44%.