الابواغ الخبيئة في الأطفال السويين والمثبطين مناعيا وتحضير مستضد الطفيلي واستخدامة في اختبار التألق المناعي غير المباشر IFAT

مي حميد كوان و مولود محمد شذر[I]

الخلاصة

أجريت الدراسة الوبائية على مجموعتين من الأطفال المصابين بالإسهال المائي في بعض مستشفيات بغداد (مجموعة الأطفال المراجعين سويي المناعة ومجموعة الأطفال الراقدين المثبطين مناعيا). شخصت الإصابة باستعمال صبغة زيل نلسن المحورة الباردة , كما تم تحضير مستضد أكياس البيض الكاملة بعد إحداث إصابة تجريبية في عجلين بأكياس البيض المعزولة من الأطفال واستخدام هذا المستضد في اختبار التألق المناعي غير المباشر.

بلغت النسبة المئوية في مجموعتي الأطفال المراجعين والراقدين 21.2% و 32 % على التوالي , كما وجد اختلافا في النسب المئوية للإصابة في المجاميع الثلاثة للأطفال المثبطين مناعيا ,فكانت أعلى نسبة 36.4 % في الأطفال المصابين بأمراض الدم والليوكيميا والمستلمين للعلاجات الكيميائية والإشعاع .لم يسجل فرقا معنويا في النسب المئوية بين الذكور والإناث .

ظهرت العلامات السريرية للإصابة التجريبية في عجلي التجربة بعد 4 أيام واستمرت لمدة 10 أيام , وقد لوحظت أكياس بيض الطفيلي في اختبار التألق المناعي غير المباشر بشكل كروي وذات حدود واضحة ولون اخضر مصفر ومتألق , ولم يسجل فرقا معنويا بين النسب المئوية للتشخيص بطريقة الصبغة وطريقة الاختبار المناعي.

Epidemiological study of cryptosporidiosis in immunocompetent & immunocompromised children, prepared parasitic antigen and used it in IFAT

Kawan.M.H ,Shether.M.M[II]

Summary

An epidemiological study was done on 2 groups of children infected with watery diarrhea in some hospitals of Baghdad (group 1: immunocompetent outpatients, group 2: immunosuppressed inpatients).
Modified cold Ziehl Neelsen stain was used in diagnosis. The whole

[I] قسم الطفيليات – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد

[II] Department of parasitology, college of veterinary medicine, university of Baghdad.

oocysts antigen prepared after conduction of experimental infection in 2 calves by using isolated oocysts from children stool, and this prepared antigen was used in Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT).

The percentage of infection in the 2 groups of outpatients and inpatients were 21.2% and 32% respectively, and there was a difference in percentage of infection between the 3 groups of children, the highest was 36.4% in group with leukemia and received chemical and radiotherapy.

There was no significant difference between the two sexes.

The clinical signs of experimental infection began after 4 days and continued for 10 days. The oocysts appeared in IFAT as spherical in shape with clear walls and bright yellowish green color. There was no significant difference between the 2 methods used for diagnosis (stain and immunological test).

المقدمة

داء الابواغ الخبيئة cryptosporidiosis هو من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان , وتسببة أنواع جنس *Cryptosporidium*[1] . تتطفل أنواع الجنس على الحافة الفراشتية للخلايا الطلائية للأمعاء والجهاز التنفسي للبائن والطيور مسببا إسهالا شديدا وخاصة في الأعمار الصغيرة والرضع[2].

يعتبر داء الابواغ الخبيئة من الأمراض ذات الوبائية العالية الحدوث نظرا لقصر دورة حياة الطفيلي[3],وحدوث الإصابات المتكررة التي تؤدي إلى طرح أعداد كبيرة من أكياس البيض التي تكون مصيبة حال خروجها من المضيف[4],وتستطيع مقاومة الظروف البيئية القاسية لمدة ثلاثة اشهر ولها القابلية على مقاومة المعقمات الاعتيادية والمعقمات التي تستعمل في المستشفيات , ومقاومة مادة الكلور التي تستعمل في تعقيم مياه الشرب[5],إضافة إلى إن جرعة صغيرة من أكياس البيض تعتبر كافية لأحداث الإصابة[7,6].تختلف الأعراض المرضية في الإنسان حسب العمر والحالة المناعية [8], حيث يتميز المرض في ذوي المناعة الطبيعية لاسيما الأطفال بإسهال مائي حاد ومغص ناتج عن التهاب المعدة والأمعاء وغثيان وقيء وارتفاع في درجة الحرارة [9],أما في المضائف التي تعاني عوزا مناعيا كمرضى الإيدز وبعض الاعتلالات المناعية الأخرى مثل الليوكيميا والمصابين بأمراض الكلى ونقص الكلوبيولينات المناعية والنساء الحوامل وبعض أمراض الجهاز الهضمي وسوء التغذية والمعالجين بالستيرويدات والأدوية التي تحدث هبوطا مناعيا فيستمر المرض لمدة طويلة ويتحول الى النوع المزمن[10],حيث يتصف بإسهال شديد يزداد على مدى أسابيع ثم اشهر ليصل حجم الغائط 17 لترا يوميا [11] , وقد يؤدي فقدان الكهارل وانعدام الامتصاص إلى جفاف حاد ينتهي بالوفاة [12] , وان نسبة الوفيات في مرضى الإيدز المصابين بالطفيلي في أوربا قد وصلت إلى 3-15%[10].

يسبب المرض في الحيوانات خسائر اقتصادية كبيرة من خلال انتشاره بين الحيوانات وخاصة العجول حيث تحدث إصابة عالية في العجول الرضيعة تتراوح نسبتها 30-70% ترافقها هلاكات تصل

إلى 50%[13] , ويتصف المرض في الحيوانات بإسهال مائي شديد ذي لون اخضر أو اصفر مع ارتفاع في درجة الحرارة وجفاف ورقود يؤدي إلى الوفاة في الحالات المتقدمة [14].

سجلت بعض الدراسات بسبة انتشار الطفيلي في أطفال محافظة بغداد , حيث سجلت AL-Hashimi(2000)[15] نسبة الإصابة في الأطفال وبلغت 13.6% وسجلت كوان (2003)[16] نسبة مقدارها 14% في الأطفال و37.27% في العجول , أما الكيلاني (2003)[17] فقد سجلت نسبة بلغت 14.6% في أطفال قرية الذهب الأبيض في منطقة أبي غريب .

شخص طفيلي *Cryptosporidium* مختبريا بطرائق مختلفة كان أهمها صبغ مسحات البراز بصبغة زيل نلسن المحورة الباردة والكينون الصامد للحامض [18] , أما مناعيا فكان اختبار التألق المناعي غير المباشر ذو فعالية عالية في التشخيص وباستعمال أكياس البيض الكاملة المعزولة والمنقاة من براز الإنسان والحيوانات كمستضدات [19].

إن الهدف من الدراسة هو تشخيص طفيلي الابواغ الخبيئة في الأطفال سوي المناعة والمثبطين مناعيا إضافة إلى تشخيص الطفيلي في الأطفال استعمال فحص التألق المناعي غير المباشر بعد أحداث إصابة تجريبية في العجول لغرض تحضير مستضد الطفيلي .

طرائق العمل

جمعت 400 عينة غائط من مجموعتين من الأطفال بأعمار 1-10 سنوات ومن كلا الجنسين : المجموعة الأولى شملت 250 عينة(143 ذكر و107 أنثى) من الأطفال المصابين بالإسهال المائي المرافق لأعراض المغص والقيء وارتفاع درجة الحرارة والجفاف (مجموعة الأطفال السويين) والمراجعين إلى كل من مستشفيات المنصور والطفل المركزي والزهراوي للأطفال في بغداد , والمجموعة الثانية شملت 150 عينة (82ذكر و68 أنثى) من الأطفال المصابين بالإسهال المائي الحاد (مجاميع الأطفال المثبطين مناعيا) والراقدين في المستشفيات المذكورة ومقسمين بشكل مجاميع :(1)الأطفال المستلمين للعلاجات الكيميائية والإشعاع (مجموعة أمراض الدم والليوكيميا) وشملت 88 طفل , (2) مجموعة الأطفال المصابين بأمراض الجهاز الهضمي وسوء التغذية وشملت 42 طفل ,(3) مجموعة الأطفال المصابين بأمراض القصور والفشل الكلوي ومستلمين بعض العلاجات التي تحدث هبوطا مناعيا وشملت 20 طفل . كما تم جمع 400 عينة دم من مجاميع الأطفال لاستخدام المصول في الاختبار المناعي .

تم استعمال صبغة زيل نلسن المحورة الباردة لتشخيص أكياس بيض طفيلي الابواغ الخبيئة في عينات الغائط [20].

الإصابة التجريبية وتحضير مستضد الطفيلي :-

جمعت أكياس بيض الطفيلي من غائط بعض الأطفال المصابين بالإسهال بعد تشخيص الإصابة, ثم عزلت أكياس البيض باستخدام المحلول السكري المشبع (21).

أصيب عجلان بعمر 7 أيام بأكياس بيض الطفيلي المعزولة من الأطفال عن طريق الفم (22). تم فحص البراز يوميا بعد اليوم الثاني من الإصابة ولغاية نهاية التجربة (10 أيام) باستخدام صبغة زيل نلسن المحورة الباردة, ثم جمعت أكياس بيض الطفيلي من براز العجول.

حضر مستضد الطفيلي من أكياس البيض الكاملة بعد جمعها وتنقيتها وحسب طريقة (19) واستعملت عينات المصول والمستضد لأجراء اختبار التألق المناعي غير المباشر وباستعمال المقترن Rabbit Anti Human With Fluorescent (RAH/FITC) Isothio-Cyanate المحضر من شركة Nordic الهولندية .

استعمل فحص t-test لمقارنة النتائج إحصائيا وتحت مستوى $p<0.01$ و $p<0.05$.

النتائج

أظهرت نتائج الدراسة وجود تفوق في نسبة الحالات الموجبة في الأطفال الراقدين (المثبطين مناعيا) بمستوى $p<0.05$ مقارنة مع الحالات الموجبة في الأطفال المراجعين (السويين) (جدول 1).

كما أشارت النتائج إلى وجود تفوق في نسبة الحالات الموجبة في مجموعة الأطفال المصابين بأمراض الدم واللوكيميا وبشكل غير معنوي $p<0.05$ مقارنة مع عدد الحالات الموجبة في مجموعتي الأطفال المصابين بأمراض الجهاز الهضمي وسوء التغذية والمصابين بأمراض القصور والفشل الكلوي (جدول2).

لم يسجل فرق معنوي بين النسبة المئوية للإصابة بالطفيلي في الذكور والإناث في مجموعتي الأطفال المراجعين والراقدين (جدول3).

الإصابة التجريبية واختبار التألق المناعي غير المباشر:-

لوحظت العلامات السريرية في عجلي التجربة بعد 4 أيام من الإصابة التجريبية حيث تغير لون وقوام البراز إلى إسهال مائي اصفر وذا رائحة كريهة وظهرت علامات الخمول وفقدان الشهية واستمرار ذلك 10 أيام .

ظهرت أكياس بيض الطفيلي في اختبار التألق غير المباشر الموجب بشكل كروي وذات حدود واضحة ولون اخضر مصفر متألق (شكل1).

لم يسجل فرق معنوي بين النسب المئوية للتشخيص بطريقة الصبغ والاختبار المناعي (جدول4).

جدول(1):- النسب المئوية للإصابة بطفيلي الابواغ الخبيئة *Cryptosporidium* في الأطفال المراجعين والراقدين في المستشفيات.

مجاميع الأطفال	عدد الحالات المفحوصة	عدد الحالات الموجبة ونسبتها المئوية	عدد الحالات السالبة ونسبتها المئوية
الأطفال المراجعين (السويين)	250	(%21.2)53	(%78.8)197
الأطفال الراقدين (المثبطين مناعيا)	150	(%32)48	(%68)102
المجموع الكلي	400	(%25.3)101	(%74.8)299

يوجد فرق معنوي $p<0.05$ بين المجموعتين.

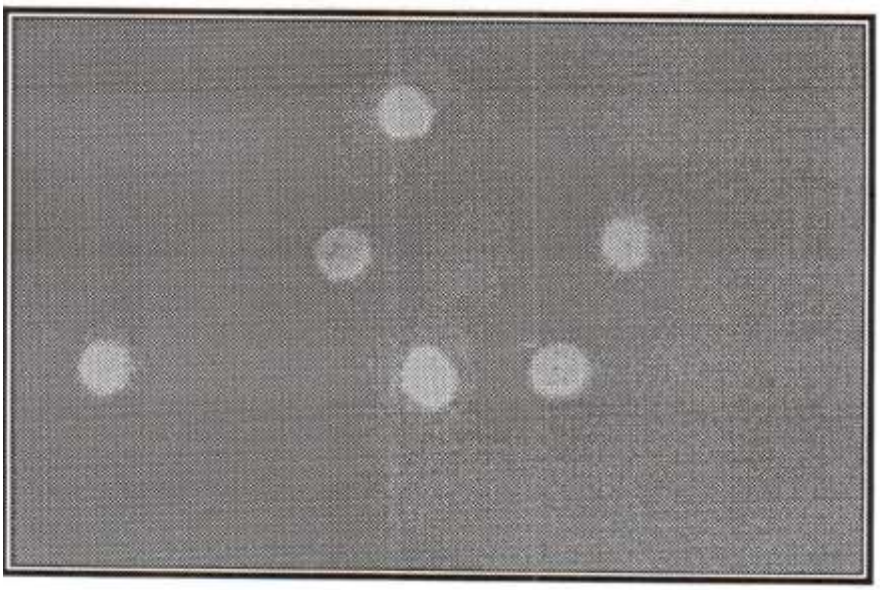
جدول (2): النسبة المئوية للإصابة بطفيلي الابواغ الخبيئة *Cryptosporidium* في مجاميع الأطفال الراقدين في المستشفيات .

مجاميع الأطفال الراقدين (المثبطين مناعيا)	عدد الحالات المفحوصة	عدد الحالات الموجبة ونسبتها المئوية	عدد الحالات السالبة ونسبتها المئوية
1.الأطفال المصابين بأمراض الدم والليوكيميا .	88	(%36.4)32	(%63.6)56
2. الأطفال المصابين بأمراض الجهاز الهضمي وسوء التغذية .	42	(%28.6)12	(%71.4)30
3. الأطفال المصابين بأمراض القصور والفشل الكلوي .	20	(%20)4	(%80)16
المجموع الكلي	150	(%32)48	(%68)102

جدول (3): النسبة المئوية للإصابة بطفيلي الابواغ الخبيئة *Cryptosporidium* في الأطفال المراجعين والراقدين وحسب الجنس .

مجاميع الأطفال		عدد الحالات المفحوصة	عدد الحالات الموجبة ونسبتها المئوية	عدد الحالات السالبة ونسبتها المئوية
الأطفال المراجعين	ذكور	143	(%21)30	(%79)113
	إناث	107	(%21.5)23	(%78.5)84
المجموع		250	(%21.2)53	(%78.8)197
الأطفال الراقدين	ذكور	82	(%34.1)28	(%65.9)54
	إناث	68	(%29.4)20	(%70.6)48
المجموع		150	(%32)48	(%68)102

شكل (1): أكياس بيض طفيلي الابواغ الخبيئة باختبار التألق المناعي غير المباشر (1000 x)



جدول (4): المقارنة بين طريقتي التشخيص المستخدمة في الدراسة

طريقة التشخيص	عدد الحالات المفحوصة	عدد الحالات الموجبة ونسبتها المئوية	عدد الحالات السالبة ونسبتها المئوية
صبغة زيل نلسن المحورة الباردة	400عينة غائط	101(25.3%)	299(74.8%)
اختبار التألق المناعي غير المباشر	400عينة مصل	101(25.3%)	299(74.8%)

المناقشة

أشارت النتائج إلى أن النسبة المئوية الكلية لإصابة الأطفال بطفيلي الابواغ الخبيئة هي 25.3% وان هذه النسبة فاقت النسب التي سجلها بعض الباحثين في بغداد حيث سجلت AL–Hashimi(2000) [15] نسبة 13.6% وسجلت كوان (2003)[16] نسبة 14% والكيلاني (2003)[17] سجلت نسبة 14.6% في أطفال قرية الذهب الأبيض , وقد عزى سبب ارتفاع نسبة الإصابة في الأطفال إلى تردي الظروف الصحية والبيئية وكثرة مياه المجاري بسبب سوء تصريف المياه وكثرة الأوساخ وخاصة في الظروف الحالية وبعد الحرب .

سجل اختلافا بين نسب الإصابة بالطفيلي في الأطفال المراجعين والراقدين حيث بلغت النسب 21.2% و 32% على التوالي , وقد يعود الاختلاف إلى التثبيط المناعي الشديد والذي يحدث من جراء الإصابات الأخرى وتعاطي العقارات التي تحدث هبوطا مناعيا مما يزيد في نسبة الإصابة [23] , وقد ارتبط ذلك في النتائج الموضحة في جدول (2) حيث وجد أن أعلى نسبة للإصابة بلغت في الأطفال المصابين بأمراض الدم والليوكيميا والمعالجين بالإشعاع والعقارات الكيميائية التي تضعف الجهاز المناعي واتفقت هذه النتائج مع AL-Hashimi(2000)[15] في إن نسبة الإصابة كانت أعلى في مجاميع الأطفال المستلمين للعلاج الكيميائي والإشعاع .

بينت الدراسة بعدم وجود فرق معنوي في نسب الاصابة بين الجنسين , وقد اتفق ذلك مع الطائي (1997)[24] في محافظة ديالى ومع Al-Hashimi(2000)[15] ,كوان (2003)[16] والكيلاني (2003)[17] في محافظة بغداد , والسبب في ذلك يعود الى كون الاطفال ذكورا واناثا معرضين للاصابة كونهم بتماس مع البيئة الخارجية وخصوصا في الاعمار الصغيرة.

جاءت نتائج الإصابة التجريبية في العجول متفقة مع الزبيدي (1994)[25] في بغداد عندما أحدث الإصابة التجريبية في الحملان , حيث ظهرت العلامات السريرية وخاصة الإسهال المائي بعد 3 أيام من الإصابة واستمرت العلامات إلى حوالي 10 أيام تراجعت بعدها حيث تحول البراز المائي إلى عجيني [22].

استعملت الدراسة أكياس بيض الطفيلي الكاملة والنقية كمستضد واتفقت في ذلك مع (1987) Casemore[19] حيث أشار إلى كفاءة استعمال أكياس البيض الكاملة المعزولة والنقية في اختبار التألق المناعي غير المباشر لتشخيص الطفيلي ولغرض الدراسات الوبائية , وقد ظهرت أكياس البيض في الاختبار الموجب بشكل كروي ذا حدود واضحة وبلون اخضر مصفر ومتألق , أما الاختبار السالب فظهرت فيه أكياس البيض بشكل كروي باهت , وقد اتفقت هذه النتائج مع (1997) Garcia Shimizu[26] وكوان (2003)[16].

أظهرت طريقتي التشخيص بصبغة زيل نلسن المحورة الباردة واختبار التألق المناعي غير المباشر كفاءة متماثلة , حيث تعتبر الطريقة الأولى حساسة جدا وتكشف عن إعداد قليلة من أكياس البض في عينة البراز [27,16,15], وقد أعطت الطريقة الثانية نتائج متماثلة من حيث كفاءة التشخيص وحساسيتها في تشخيص الإصابات المبكرة وفي الأعمار الصغيرة[28].

***References*:-**

1. Riggs MW.;McNeil, MR. ;Perryman LE.;Stone,AL.;Scherman, MS.And O'Connor , RM. (1999) Cryptosporidium parvum sporozoite pellicle antigen recognized by a neutralizing monoclonal antibody is a betamannosylated glycolipid . Infect. Immun . 67(3):1317-1322.
2. Current, WL.(1998) Cryptosporidiosis: In Microbiology and Microbial infections .9th ed.P:5-329.
3. Anderson ,BC.(1981)Patterns of shedding of Cryptosporidial oocysts in Idaho calves . J.Am.Vet. Med. Assoc. 181(2):151-153.
4. Casemore, DP.(1989)Human Cryptosporidiosis. Recent Advances in Infection .3:209-236.
5. Fayer,R.;Speer,CA.and Duby, JP.(1997)General biology of Cryptosporidium and Cryptosporidiosis of man and animal. Boca Raton FI CRC Press. P:1-242.
6. Haas,CN.And Rose,JB.(1994)Reconciliation of microbial risk models and outbreak epidemiology : the case of Milwaukee outbrealt. American Water Works Association, 517-523.
7. Richard ,E.;Robert ,M.and Ann,M.(1996)Cryptosporidiosis and coccidial infection . In Nelson Textbook of Pediatrics. 15th ed.P:968-970.

8. Kirkpatrick, BD.And Sears,CL.(2000)Cryptosporidiosis in Cecil's textbook of Medicine . 21st ed .Goldman ,L.and Bennett,JC.eds. WB.Saunders Company,America .P:1967-1969 .
9. Udaya, BS.And Prakash,MD. (1997)Cryptosporidiosis and coccidial infections. Mayo Int.Med. Board. Rev.968-969.
10. Pilarczyk,B. and Balicka-Ramisz, A. (2002)Prevalence of cryptosporidium sp.In farm animals in western Pomerania .J.Polish agricultural universities. Vol. 5 Issuel series Animal husbandary.
11. Goodgame, RW.(1996)Understanding intestinal spore-forming protozoa: Cryptosporidia, Microsporidia , Isospora, and Cyclospora. Ann. Intern.Med.124:429-441.
12. Markell,Ek.; John,DT.and Krotoski, WA.(1999)Markell and Voge's Medical Parasitology . 8th ed. WB. Saunders Company, Philadelphia, P:78.
13. Jerret, IV. and Snodgrass, DR. (1981) Cryptosporidia associated with outbreak of neonatal calf dirrreha .Aus. Vet.J. 57:434-435.
14. Scott,CA., Smith, HV., Matmbo ,MMA.and Gibbs,HA. (1995)An epidemiological study of Cryptosporidium parvum in tow herds of adult beef cattle. Vet. Parasitol.57:277-288.
15. AL-Hashimi, AK. (2000) Epidemiological and diagnostic study of cryptosporidiosis in children suffering from diarrhea.M.Sc.Thesis, College of Science, AL-Mustansiryia Universty.

16.كوان, مي حميد (2003) دراسة في وبائية الإصابة بطفيلي الابواغ الخبيئة واستخدام مستضد في التشخيص وتجريب فعالية زيوت بعض النباتات الطبية في العلاج.

أطروحة دكتوراة – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد .

17.الكيلاني , بان عبد الوهاب (2003)دراسة وبائية وتشخيصية لطفيلي الابواغ الخبيئة في الإنسان والحيوان في قرية الذهب الأبيض . أطروحة دكتوراة –كلية الطب البيطري – جامعة بغداد .

18. El-Naggar, HH.; Handousa, AE. ;El-Hamshary ,EM. And Eishazly ,AM.(1999)Evaluation of Five Stains in Diagnosing Human Intestinal Coccidiosis. J.Egypt. Soc. Parasitol. 29(3):883-891.
19. Casemore ,DP. (1987)The antibody response to Cryptosporidium: Development of a serological test and use in a study of immunologically normal persons .J.Infec. 14:125-134.
20. Beaver ,PC.And Jung ,RC.(1985)Animal agents and vector of human disease .5th ed.Lea and Febiger .P:249.
21. Bowman ,DD.And Lynn, RC.(1995)Georgis Parasitology for Veterinarians. 6th ed.WB.Saunders Company. Philadelphia.USA.P:87-89.

22. Ananthasubramanian, Mand and Ananthan ,S.(1997) Cryptosporidium parvum propagation of oocyst in neonatal calves. Ind.J.Pathol.Microbiol.40(4):469-472.
23. Goodgame ,RW.;Genta, RM.;Clinton ,White A.and Chappell,CL.(1993)Intensity of Infection in AIDS- associated cryptosporidiosis.J.Infec. Dis.167:704-709.
24.الطائي, مجيد حمود (1997) دراسة وبائية داء الابواغ الخبيئة في العجول .رسالة ماجستير – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد.
25. الزبيدي ,محمد ثابت (1994)دراسة في داء الكربتوسبوريديوسز في العجول . رسالة ماجستير – كلية الطب البيطري –جامعة بغداد.
26. Garcia, LS. and Shimizu, RY.(1997)Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescent)for detection of Giardia lamblia and Cryptosporidium parvum in human fecal specimens .J.Clin. Microbiol. 35(6):1526-1529.
27. Webster, KA.; Green,JA.;Dawson ,C.;Giles, M.and Catchpole, J.(1996)Diagnostic methods for the detection of Cryptosporidium parvum oocysts in feces .J.Protozool.Res.:11-20.
28. Yiao, L.; Herd,RP.and Rings ,DM.(1993b)Diagnosis of Cryptosporidium on farm with neonatal diarrhea by immunoflourescent assays. Vet. Parasitol.51:17-23.