حساب معدل طرح أكياس بيض طفيلي الابواغ الخبيئة من الأبقار الحوامل

منى موسى خليل، محمد ثابت صالح الزبيدي وفوزية شعبان كاظم
كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة التحري عن أكياس بيض طفيلي الابواغ الخبيئة المطروحة من الأبقار الحوامل. جمعت 120 عينة براز من أبقار حوامل في الشهر السابع من الحمل من محطة النصر لتربية الأبقار للمدة من بداية تشرين الثاني 2009 إلى نهاية شباط 2010. استعملت طريقة الزيل نلسن المحورة في فحص البراز، إذ أعطت 40 بقرة 33.33% نتائج موجبة للإصابة ، وظهرت أكياس البيض كروية الشكل وذات لون احمر وبلغ معدل قياسها 4.2×5.2 مايكرومتر. جمعت عينات براز من الأبقار التي أعطت نتائج ايجابية أسبوعيا ولمدة 18 أسبوع (9 أسابيع قبل الولادة وأسبوع الولادة و 8 أسابيع بعد الولادة)، وحسبت أعداد أكياس البيض المطروحة/غرام من البراز ، بلغ معدل أعداد أكياس البيض/ غرام من البراز 810 كيس بيضة في الأسبوع التاسع قبل الولادة (أول أسبوع لجمع العينات) ووصل إلى أعلى مستوى له 2500 كيس بيضة/ غرام من البراز (أسبوع الولادة) ثم انخفض تدريجيا ليصل إلى 260 كيس بيضة/ غرام من البراز في الأسبوع الثامن بعد الولادة. نستنتج من ذلك ان لعوامل الحمل والولادة تأثيرا على أعداد أكياس البيض المطروحة.

Cryptosporidial oocysts shedding from pregnant cows

M. M. Khalil, M. Th. S. Al- Zubaidi and F. S. Kadhim
College of Veterinary Medicine\ University of Baghdad

Abstract

The study aimed to investigate the shedding rate of cryptosporidial oocysts from pregnant cows. A total of 120 fecal samples were collected from pregnant cows (in the beginning of the seventh month of gestation) from Al-Nasir Station during the period from November 2009 till the end of February 2010. Modified Zeihl-Neelsen Stain (MZN) was used to examine the samples where 40 cows 33.33% gave positive results. The oocysts appeared spherical in shape and had red colour with Zeihl-Neelsen, and measured 4.2 ×5.2 µm. Fecal sample were collected from the infected 40 cows for 18 weeks (9 before parturition, parturition week, and 8 weeks after parturition). Numbers of shedded oocysts per gram of feces were determined. The average number of oocysts per gram of feces was 810 oocysts in the nineth week pre- parturition. This average reached its peak in the week of parturition (2500 oocysts/ gram of feces), then it declined gradually to 260 oocysts per gram of feces in the eighth week post- parturition. We can conclude that factors of pregnancy and parturition have effects on the numbers of oocysts shedded with feces.

المقدمة

تعد الإصابة بطفيلي الابواغ الخبيئة من أهم مسببات الإسهال في العجول الرضيعة، فيما يعد المرض أكثر انتشارا في الأبقار مقارنة مع الحيوانات الأخرى(1). لقد وجد اعتمادا على الفحص المجهري ان الأبقار تصاب

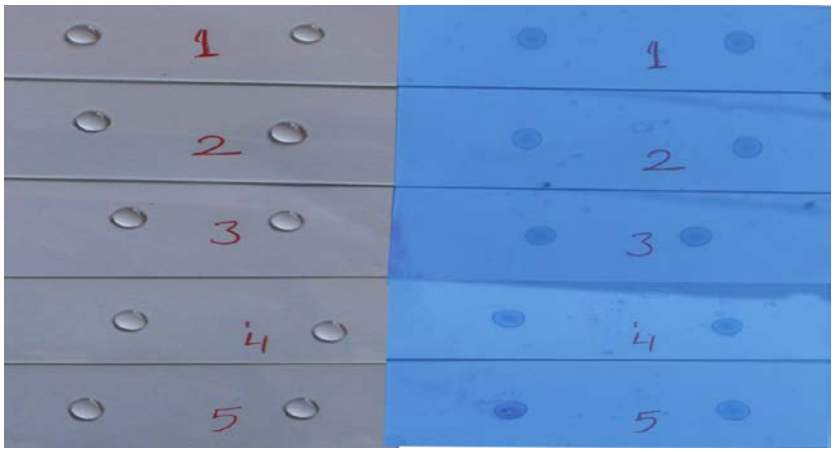
بالنوعين *C. parvum* و*C. muris* وبعد استخدام الاختبارات الجينية وجد ان النوع *C. andersoni* هو احد مسببات الإصابة في الأبقار (2)، وأول من سجل المرض في الأبقار (3) في حالة إسهال لعجلة بعمر 8 أشهر، وسجل (4) أول اندلاع للمرض في عجول أبقار الحليب واللحم في كندا حيث كانت الإصابة 100% ونسبة الهلاكات 20%، وسجل (5) 20 اندلاعا للإصابة بالطفيلي في صغار المواشي للمدة بين 1976–1980 في كل من كندا والولايات المتحدة الأمريكية وانكلترا. وفي العراق سجلت نسب إصابات مختلفة، ففي نينوى سجل (6) نسبة إصابة 26.5% وسجل (7) في محطات تربية الأبقار نسبة إصابة بلغت 33.37% وأشار (8) إلى ان نسبة إصابة العجول الرضيعة في بغداد كانت 6.19%، فيما لاحظت (9) إلى ان هذه النسبة بلغت 37.27% في محطات تربية الأبقار. استهدفت هذه الدراسة التحري عن أكياس بيض طفيلي الابواغ الخبيئة المطروحة من الأبقار الحوامل لمدة 18 أسبوعا (9 قبل الولادة وأسبوع الولادة و8 بعد الولادة) لمعرفة مدى تأثير الحمل والولادة على معدل طرح أكياس البيض لهذا الطفيلي.

المواد وطرائق العمل

- **جمع العينات من الأبقار:** جمعت 120 عينة براز 20غم/ بقرة من أبقار في الشهر السابع من الحمل (بعمر 2.5– 6 سنوات) من محطة أبقار النصر خلال شهر تشرين الثاني 2009. جمعت العينات من مستقيم الحيوانات مباشرة ، ووضعت في عبوات بلاستيكية نظيفة ومحكمة الغلق. سجلت كافة المعلومات الخاصة بالحيوان، العمر ، تاريخ اخذ العينة والعلامات السريرية (ان وجدت) على استمارة خاصة تحمل رقم العينة. نقلت العينات إلى مختبر الطفيليات التابع لكلية الطب البيطري/ جامعة بغداد في حافظة مبردة لإجراء الفحوصات المختبرية. استخدمت طريقتا الزيل نلسن المحورة والتطويف بالمحلول السكري المشبع لتشخيص الطفيلي 10 حيث شخصت الإصابة في 40 بقرة من مجموع 120 وقد جمع البراز من هذه الحيوانات المصابة أسبوعيا ولمدة 18 أسبوعا (9 قبل الولادة وأسبوع الولادة و 8 بعد الولادة) وحسبت أعداد أكياس البيض المطروحة لكل غرام من البراز.
- **حساب أعداد أكياس البيض:** استعملت طريقة 10 لحساب أعداد أكياس البيض المطروحة لكل غرام من البراز وحسب الخطوات الآتية:

1. مزج 1 غرام من البراز في دورق زجاجي نظيف مع 20 مليلتر من الماء المقطر ثم رشح المزيج خلال 4 طبقات من الشاش ، جمع الراشح بأنابيب اختبار سعة 10 مليلتر ثم دور بجهاز الطرد المركزي بسرعة 500 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق.
2. أضيف 9 مليلتر من دارئ الفوسفاتي الملحي لكل أنبوبة ومزجت جيدا ودورت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 700دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة حيث كررت هذه العملية مرتين ، علق بعدها الراسب بـ 1 مليلتر من المحلول الدارئ.
3. اخذ 5 مايكرولتر من العالق بواسطة ماصة دقيقة وأسقطت بشكل حر على شريحة زجاجية نظيفة بدون فرشها، تركت الشرائح لتجف ثم ثبتت بالكحول المثيلي المطلق 100% لمدة 5 دقائق وصبغت بصبغة الزيل نلسن المحورة.
4. حسبت أكياس البيض في قطرتين لكل شريحة (للتأكد من العدد) باستخدام المجهر الضوئي بقوة 100 × حيث قدرت أعدادها كما يلي:

عدد أكياس البيض في 1 غرام من البراز = عدد أكياس البيض في 5 مايكرومتر ×200. صورة (1)



صورة (1) طريقة 10 لعد أكياس البيض في براز الأبقار الأمهات

استخدم المقياس العيني الدقيق Ocular Micrometer لقياس أبعاد أكياس البيض والذي يتكون من عدسة عينية تحتوي على تدريجات من 10-100. يستخرج قياس كل تدريجة بالمايكرومتر باستخدام المسرح القياسي الدقيق Stage Ocular Micrometer، وهي عبارة عن شريحة زجاجية مجهرية تضم مقياسا طوله 1 ملم مقسم إلى 100 تدريجة متساوية، قياس كل منها 0.01 ملم والذي يعادل 10 مايكرومتر. توضع الشريحة على منصة المجهر، وتتطابق تدريجة الصفر في كل من العدسة والشريحة الزجاجية انطباقا تاما وتقرأ قيمة خطين متطابقين في العدسة والشريحة ثم يستخرج المعدل لثلاث قراءات، وللحصول على معامل المجهر طبقت المعادلة التالية:

$$\text{معامل المجهر} = \frac{\text{معدل قراءات المسرح القياسي الدقيق}}{\text{معدل قراءات المقياس العيني}} \times 10 \text{ مايكرومتر} \quad (11)$$

وقد قيست أبعاد أكياس البيض للأربعين حالة الموجبة بمعدل عشرة أكياس للحالة الواحدة.

- **التحليل الإحصائي:** استخدم اختبار تحليل التباين Analysis of variance لإيجاد أقل فرق معنوي بين معدلات أكياس البيض المطروحة لكل غرام من البراز (12).

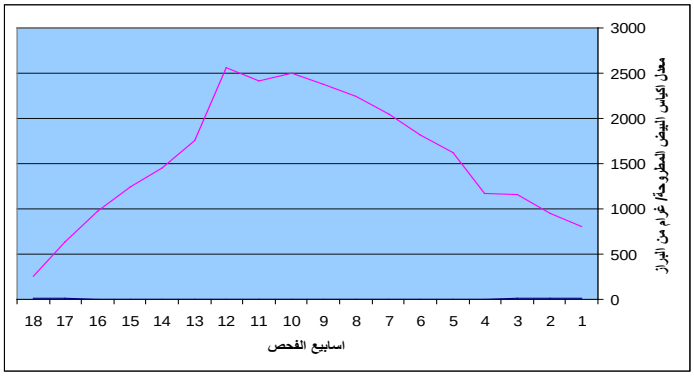
النتائج

أظهرت الدراسة ان 33.33% (40 بقرة مصابة) من الأبقار البالغة في الشهر السابع من الحمل طرحت أكياس بيض الطفيلي مع البراز بدون علامات سريرية. بلغ معدل أعداد أكياس البيض/ غرام من البراز 810 كيس بيضة في الأسبوع التاسع قبل الولادة (أول أسبوع لجمع العينات) وارتفع هذا المعدل ليصل إلى ذروته في الأسبوع الذي حصلت فيه الولادة إذ بلغ 2500 كيس بيضة/ غرام من البراز ، ثم تأرجح معدل الطرح بين الانخفاض والارتفاع حتى الأسبوع الرابع بعد الولادة حيث انخفض إلى 1450 كيس بيضة/ غرام من البراز واستمر بالانخفاض إلى الأسبوع الأخير من الدراسة (الأسبوع الثامن بعد الولادة) إذ بلغ 260 كيس بيضة/ غرام من البراز، كما موضح في الجدول (1) والشكل البياني (1).

جدول (1) العدد الكلي ومعدل أكياس البيض المطروحة من الأبقار الأمهات/ غرام من البراز

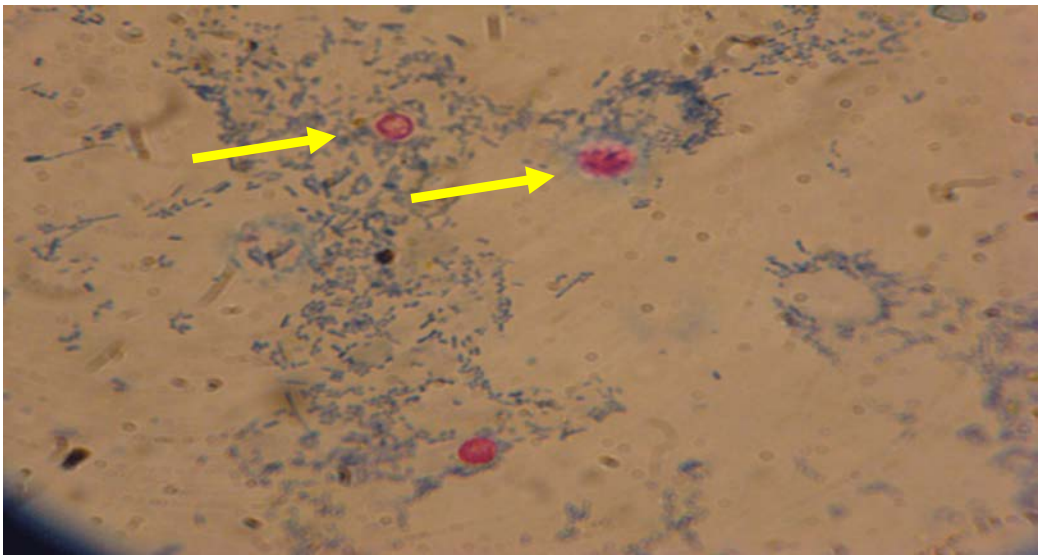
أسابيع جمع العينات	العدد الكلي لأكياس البيض المطروحة من الأبقار الحوامل/غرام من البراز	معدل أكياس البيض /غرام من البراز
أول أسبوع للجمع الأسبوع 9 قبل الولادة	32400	810[a]
ثاني أسبوع للجمع الأسبوع 8 قبل الولادة	38000	950[ab]
ثالث أسبوع للجمع الأسبوع 7 قبل الولادة	46400	1160[b]
رابع أسبوع للجمع الأسبوع 6 قبل الولادة	47000	1175[b]
خامس أسبوع للجمع الأسبوع 5 قبل الولادة	64800	1620[c]
سادس أسبوع للجمع الأسبوع 4 قبل الولادة	72800	1820[d]
سابع أسبوع للجمع الأسبوع 3 قبل الولادة	81800	2045[e]
ثامن أسبوع للجمع الأسبوع 2 قبل الولادة	89600	2240[e]
تاسع أسبوع للجمع الأسبوع 1 قبل الولادة	95000	2375[e]
الولادة	100000	2500[f]
عاشر أسبوع للجمع الأسبوع 1بعد الولادة	96400	2410[ef]
11 أسبوعا للجمع الأسبوع 2 بعد الولادة	102400	2560[f]
12 أسبوعا للجمع الأسبوع 3 بعد الولادة	70400	1760[cd]
13 أسبوعا للجمع الأسبوع 4 بعد الولادة	58000	1450[c]
14 أسبوعا للجمع الأسبوع 5 بعد الولادة	50000	1250[b]
15 أسبوعا للجمع الأسبوع 6 بعد الولادة	39200	980[b]
16 أسبوعا للجمع الأسبوع 7 بعد الولادة	25600	640[g]
17 أسبوعا للجمع الأسبوع 8 بعد الولادة	10400	260[h]

***الحروف المختلفة تشير إلى وجود فرق معنوي في عدد أكياس البيض المطروحة لكل غرام من البراز.**

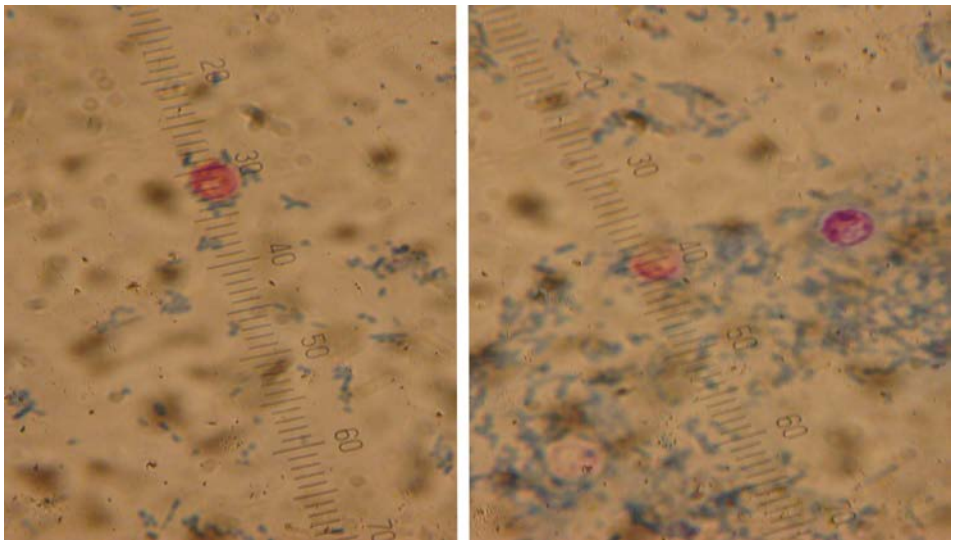


شكل (1) معدل طرح أكياس البيض من الأبقار الأمهات/ غرام من البراز

باستخدام صبغة زيل نلسن المحورة ظهرت أكياس بيض الطفيلي كروية أو بيضوية الشكل ذات جدارين و بلون احمر، فيما أخذ الجدار لوناً أغمق وظهرت البويغات سوداء غامقة على أرضية ذات لون ازرق فاتح (صورة 2). استخدم المقياس العيني لقياس أبعاد أكياس البيض إذ كانت بين 4 – 4.4 × 5.2 – 5.5 مايكرومتر و بمعدل 4.2 × 5.2 ± 0.3 مايكرومتر (صورة 3).



صورة (2) أكياس بيض طفيلي الابواغ الخبيئة في براز الأبقار والمصبوغة بالزيل نلسن 100×



صورة (3) قياس أكياس بيض الطفيلي في براز الأبقار بالمقياس العيني الدقيق 100×

المناقشة

تؤدي مناعة المضيف دورا أساسيا في مقاومة الإصابة بطفيلي الابواغ الخبيئة ، إذ ينخفض مستوى مناعة الإناث الحوامل بشكل عام مع اقتراب موعد الولادة، فقد أشار (13) إلى ان هذا الانخفاض يبدأ منذ الأسبوع الثالث قبل الولادة ويصل إلى ذروته في وقت الولادة ويستمر على ذلك لثلاثة أسابيع بعد الولادة ثم تبدأ العودة التدريجية إلى الوضع الطبيعي. ويتضح من نتائج هذه الدراسة ان معظم الأبقار التي أعطت نتائج موجبة حاملة للطفيلي وأنها تطرح أكياس البيض مع البراز قبل بدأ الدراسة، وان تأثير الحمل والولادة أدى إلى زيادة أعداد أكياس البيض المطروحة مع البراز. يعزى الارتفاع أو الانخفاض في أعداد أكياس البيض المطروحة من الأبقار الحوامل إلى التبدلات الهرمونية التي تحصل وما يتبعها من تأثيرات على الحالة المناعية للجسم، فقد أجريت العديد من الدراسات حول تأثير الحمل والولادة على نشاط الجهاز المناعي لأبقار الحليب ، إذ وجد كل من (14، 15) انخفاضا في كفاءة الخلايا العدلة Neutrophils مع اقتراب موعد الولادة، فيما لاحظ (16) انخفاضا في أعداد الخلايا البائية والتائية بنسبة 62% و40% على التوالي في هذه الأبقار ، وذكر (17) ان عدد الخلايا اللمفاوية في أبقار الهولشتاين قد بدأ بالانخفاض بشكل ثابت بدءا من الأسبوع الثاني قبل الولادة إلى حين موعد الولادة ثم بدأ بالارتفاع إلى ان وصل إلى مستواه الطبيعي في الأسبوع الثاني بعد الولادة، وهو ما أكده (18) في الأبقار السويدية الحمراء، فضلا عن ذلك فأن كفاءة هذه الخلايا باعتبارها مسؤولة عن المناعة المكتسبة بنوعيها الخلوي والخلطي تتأثر مع تقدم الحمل والولادة ، فقد وجد (19) انخفاض في قابلية +CD8 على إحداث التسمم الخلوي Cytotoxicity في الأبقار. أما على مستوى المناعة الخلطية فقد أشارت الدراسات إلى هبوط في مستويات الكلوبيولينات الرئيسة الثلاث IgG و IgM و IgA مع اقتراب موعد الولادة متزامنا مع انخفاض أعداد الخلايا اللمفاوية البائية التي تنتج هذه الكلوبيولينات (20). ووجد (21) نقصا في المستويات المصلية IL2 والانترفيرون كاما واللذان ينتجان أساسا بتأثير من +CD4 بعد الولادة مباشرة. تسهم العديد من التبدلات الهرمونية في أحداث هذا الخلل في الجهاز المناعي، حيث ان زيادة مستويات الستيرويدات والنواتج الايضية لحامض الاراكيدونك Arachedonic acid في بلازما دم الأبقار الحوامل تؤدي دورا رئيسا في ذلك (22)، غير ان العديد من الباحثين أشار إلى ان ارتفاع مستويات هرموني الاستروجين والبروجستيرون مع اقتراب موعد الولادة قد يسهم أيضا في إحداث هذا التثبيط المناعي (23)، ومن جهة أخرى فان انخفاض مستويات هرمونات أخرى قد يفاقم هذه الحالة ومن أهمها هرمون النمو Growth hormone وعامل النمو الشبيه بالأنسولين IGF-1 (Isulin-like growth factor) هو بروتين يفرز أساسا من خلايا الكبد يساعد على تنظيم النمو في المواليد الحديثة إضافة إلى دوره في نضوج الجهاز المناعي. أظهرت الدراسة ان أعلى معدلات لأكياس البيض المطروحة مع البراز كانت في الأسابيع الثلاثة الأولى بعد الولادة، ويمكن أن يعزى ذلك (إضافة إلى التغيرات الهرمونية) إلى الإجهاد الناتج عن الرضاعة وإنتاج الحليب، فضلا عن تعرض الرحم بعد الولادة مباشرة إلى الخمج البكتيري الذي يسهم في انخفاض مستوى المناعة لدى الأبقار المصابة ويؤدي إلى زيادة قابلية الابواغ الخبيئة الموجودة داخل الأمعاء على التكاثر (13). ويتضح من نتائج هذا الدراسة ان الأكياس تعود إلى النوع *C. parvum* فقد ذكر (24) ان معدل قياس أكياس بيض هذا النوع هو 4×6 مايكرومتر، فيما أشار (1) إلى ان معدل قياس هذه الأكياس هو 4.5 ×5 مايكرومتر. ومن المعروف ان الأبقار تصاب بالنوعين *C. parvum* و*C. andersoni* ، ويتراوح قياس كيس بيض النوع الثاني 6–8 ×5 –6.5 مايكرومتر (بمعدل 5.5 ×7.4 مايكرومتر) (2). من نتائج هذه الدراسة ان مرحلة الحمل والولادة في الأبقار تعد أهم العوامل التي تسهم في انتقال الطفيلي إلى العجول حديثة الولادة وبالتالي إصابتها بالإسهال لذلك يجب اتخاذ كافة الاحتياطات الممكنة لتقليل انتقال هذه الأكياس إلى العجول وذلك من خلال التخلص من براز الأمهات بشكل مستمر وتحديد حركة العاملين داخل محطة التربية.

References

1. Fayer, R. & Xiao, L. (2008). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd ed. CRC. Press.
2. Lindsay, D. S.; Upton, S. J.; Owens, D. S.; Morgan, U. M.; Mead, J. R. & Blagburn, B. L. (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplxa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. J. Eukaryot. Microbiol., 47: 91-95.
3. Panciera, R. J.; Thomassen, R. W. & Gamer, F. M. (1971). Cryptosporidia infection in calf. Vet. Pathol., 8: 479- 484.
4. Morin, M.; Lariviers, S. & Lallier, R. (1976). Pathological observation made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. Can. J. Comp. Med., 40: 228-240.
5. Tzipori, S. (1983). Cryptosporidiosis in animals humans. Microbio. Rev., 47: 84- 96.
6. الالوسي، توفيق إبراهيم والعاني، عبد العزيز والراوي ، صداع. (1993). حدوث داء الكربتوسبوريديوسز في الأطفال والعجول في محافظة الموصل، مجلة طب تكريت: 9:3-7.
7. الزبيدي، محمد ثابت صالح . (1994). دراسة في داء الكربتوسبوريديوسز في العجول. رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
8. Al-Mussawi, A. Y. & Khalaf, A. M. (1997). Some infectious causes of diarrhea in newborn calves in Iraq. The Veterinarian, 6,7(1): 106-113.
9. العزاوي، مي حميد كوان . (2003). دراسة في وبائية الإصابة بطفيلي الابواغ الخبيئة واستخدام مستضده في التشخيص وتجريب فعالية زيوت بعض النباتات الطبية في العلاج. أطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
10. Kim, C. W. (1987). Chemotherapeutic effect of arprinocid in experimental Cryptosporidiosis. J. Parasitol., 73: 663- 666.
11. Thienpont, D.; Rochette, F. & Vanparijs, O. (1979). Diagnosing heminthiasis through coprological examination. Janssen Research Foundation, PP.26- 29.
12. المحمد، نعيم ثاني والراوي ، خاشع محمود ويونس ، مؤيد احمد والمراني ، وليد خضير . (1986). مبادئ الإحصاء، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد.
13. Mallard, B. A.; Dekkers, J. C.; Ireland, M. J.; Leslie, K. E.; Sharif, S.; Lacey, C.; Wagter, L. & Wilkie, C. (1997). Alteration in Immune Responsiveness During the peripartum period and Its Ramification on Dairy Cow and Calf Health. J. Dairy. Sci., 81:585-595.
14. Kehrli, M. E.; Nnnecke, B. J. & Roth, J. A. (1989a). Alteration in bovine peripheral blood neutrophil function during the peripartum period. Am. J. Vet. Res., 50:207-214.
15. Nckerson, S. C.; Owens, W. E.; Rejman, J. J. & Oliver, S. P. (1993). Effect of interleukin-1 and interleukin-2 on mammary gland leukocyte population and histology during the early non lactating period. Zntralbl. Veterinaermed. Reihe B., 40:621-633.
16. Yang, T. J.; Mather, J. F. & Rbinovsky, (1988). Changes in subpopulation of lymphocytes in peripheral blood and supra mammary and pre scapular lymph nodes in cows with mastitis and normal cows. Vet. Immuno. Imunopathol., 18:279-285.
17. Kehrli, M. E.; Nnnecke, B. J. & Roth, J. A. (1989b). Alteration in bovine peripheral blood lymphocyte function during the peripartum period. Am. J. Vet. Res., 50:215-220.

18. Saad, A. M.; Concha, C. & Astrom, G. (1989). Alteration in neutrophil phagocytosis and lymphocyte blastogenesis in dairy cows around parturition. J. Vet. Med., 36:337-345.
19. Shafer-Weaver, K. A. & Sordillo, I. M. (1997). Bovine CD4+ suppressor lymphocyte alter immune responsiveness during the post partum period. Vet. Immunol. Immuno-pathol., 56:53-64.
20. Nagahata, H.; Ogawa, A.; Sanada, Y.; Noda, H. & Yamamoto, S. (1992). Peripartum changes antibody producing capability of lymphocyte from dairy cows. Vet. Q., 14:39-40.
21. Shafer-Weaver, K. A.; Corl, C. M. & Sordillo, L. M. (1999). Shiffts in bovine CD4+ subpopulation increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cell during the post-partum period. J. Dairy. Sci., 82:1696-1706.
22. Cai, T. O.; Weston, P. G.; Lund, L. A.; Brodie, B.; Mckenna, D. J. & Wagner, W. C. (1994). Association between neutrophil function and periparturient disorders in cows. Am. J. Vet. Res., 55:934-943.
23. Levkut, M.; Pisti, R.; Revajova, V.; Choma, J.; Levkutov, M. & David, V. (2002). Comparison of immune parameters in cows with normal and prolonged involution time of uterus. Vet. Med. Czech., 47:277-282.
24. Anderson, B. C. (1981). Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idoho calves. J. Am. Vet. Med. Assoc., 78: 982- 984.