

استخدام تقنية التآلق المناعي المباشرة وغير المباشرة في التحري عن الخمج بالديدان الإسطوانية في الضأن في محافظة نينوى

إيناس سعدي حسين و سري سالم أغوان

فرع الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

(الاستلام ١٨ شباط ٢٠١٩، القبول ١٠ آيار ٢٠١٩)

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة إجراء مقارنة بين طريقتين مختلفتين من طرق التشخيص الحديثة وذلك لتشخيص الخمج بالديدان الإسطوانية، حيث استخدمت كلا من صبغة الأكردين البرتقالية المتفلورة وعدة الصبغات المتخصصة للكتين - فلورسين لصبغ عينات براز الضأن، وتبين من خلال فحص خمسون عينة من براز الضأن إن عدة صبغة للكتين - فلورسين المتخصصة أكفاً من صبغة الأكردين البرتقالية المتفلورة حيث بلغت نسبة المؤية لعدة الصبغات المتخصصة للكتين - فلورسين ٩٦٪، في حين بلغت النسبة المؤية لصبغة الأكردين البرتقالية المتفلورة ٧٤٪، ونستنتج من هذه الدراسة أهمية استخدام عدة الكت الجاهزة للكتين - فلورسين في تشخيص بيوض الديدان الإسطوانية لأنها تمتاز بدقتها وكفائتها وسرعتها فهي تغني عن تقنية زرع البراز بغية الحصول على اليرقات للاعتماد عليها في تشخيص نوع الديدان الإسطوانية.

Uses of direct and indirect immuno-fluorescent techniques for demonstration of nematodes infection in sheep in Nineveh government

E.S. Hussein¹ and S.S. Aghwan²

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq
¹enassaadi5577@gmail.com, ²dr.s.s.aghwan@gmail.com

Abstract

This study was conducted for comparison between two different modern methods for the diagnosis of the nematode worms' infection in sheep we used acridine orange fluorochrome and specific staining kit in fecal samples. We examined 50 sheep fecal samples; the total infection rate was about 96% when was used lectin - fluorescein kit while the total infection rate was 74% when we used acridine orange fluorochrome technique. In conclusion of this study indicated that lectin - fluorescein kit is more effective than acridine orange fluorochrome in the diagnosis of nematode worms' eggs. Also, we conclude from this study the importance of using fluorescence - lectin kit technique in the diagnosis of nematodes eggs because they are distinguished by their speed, efficiency and accuracy, as they compare with the fecal culture technique to cultivate the larvae from eggs in order to diagnosed the type of nematodes eggs.

Keywords: Indirect, Direct, immunofluorescent, Lectin - Fluorescein Kit
Available online at <http://www.vetmedmosul.com>

المقدمة

البرتقالية Acridine Orange Fluorochrome لأول مرة في عام ١٩٤٢ من قبل Hilbrich و Strugger في العد الجرثومي حيث ترتبط هذه الصبغة بالحامض النووي المنقوص الأوكسجين DNA للجراثيم الحية والميتة (٢) وتتماز هذه الصبغة بالدقة والسرعة والكفاءة والأنية وقلة التكلفة (٤،٣)، استخدمت هذه الصبغة أيضاً

يعد خمج الضأن بالديدان الإسطوانية من الأمراض المهمة والشائعة لما تسببه من خسائر اقتصادية بليغة وخطيرة لمربي تلك الحيوانات في مختلف أنحاء العالم (١) استخدمت صبغة الأكردين

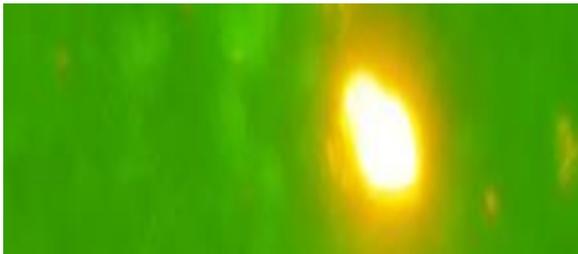
المحلول من ١٠٠ مل من Sodium Acetate Trihydrate مع ٩٠ مل من حامض الهيدروكلوريك. وضعت مسحات البراز المثبتة على الشرائح الزجاجية في محلول صبغة الأكردين البرتقالية لمدة دقيقتان دقيقة ثم غسلت الشرائح الزجاجية باستخدام ماء الحنفية وتركت لتجف بالهواء وفحصت عن طريق تسليط الأشعة فوق البنفسجية عليها المنبعثة من المجهر المتألق وتراوح الطول الموجي لانبعثات الإشعاع ٤٦٠ - ٦٥٠ نانوميتر (٢٠).

عدة صبغة اللكتين - فلورسين المتخصصة

سحق ٥٠ غم من البراز في ١٠٠ مل من محلول الملحي المشبع وصفي المزيج باستخدام المصفاة لإزالة الشوائب وترك المحلول لمدة ٣٠ دقيقة ثم رسب المحلول باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة ٣٥٠ دورة/ دقيقة لمدة خمس دقائق، سكب الراشح وجمع الراسب وأضيف إليه الماء المقطر بنسبة ١:١ وغسل الراسب ثلاث مرات بالماء المقطر للتخلص من الشوائب وحفظت العينات بالثلاجة بدرجة ٤ م لمدة ٢٤ - ٧٢ ساعة الى حين استخدامها، حيث قسمت العينة الواحدة الى ست مجاميع وكل مجموعة نضيف إليها قطرة من الصبغة المُعلّمة (المحلول المتخصص اللكتين- فلورسين، PNA, CON A, DBA, RCA, SBA, UEA) وتركت تلك الأنابيب لتحضن في غرفة معتمة طول الليل ثم أخذ قطرة منها ووضعت على شريحة زجاجية وفرشت وتركت لتجف لمدة ٣- ٥ دقائق و فحصت تحت المجهر المتألق وتراوح الطول الموجي لانبعثات الإشعاع ٤٦٠ - ٦٥٠ نانوميتر (٢١).

النتائج

تبين من خلال فحص الشرائح الزجاجية لمسحات البراز المصبوغة بصبغة الأكردين البرتقالية تشخيص أنواع مختلفة من بيوض الديدان الإسطوانية فقد بلغت النسبة الكلية للخمج بهذه الديدان ٧٥٪ وشخصت بهذه الطريقة أجناس متعددة من الديدان الإسطوانية منها: *Bunostomum spp.* (الشكل ١)، والنوع *Ostertagia spp.* (الشكل ٣)، والجنس *Trichostrongylus spp.*



الشكل ١: يوضح بيضة *Bunostomum spp.* باستخدام صبغة الأكردين البرتقالية المتفلورة، $\times 40$.

في تشخيص بعض أنواع الديدان الإسطوانية nematoda واليرقات الخيطية الدقيقة *Toxoplasma gondii* و *microfilaria* و *Trypanosoma spp.* و *Babesia spp.* (١٠-٥) وبالإضافة الى تشخيص *Plasmodium spp.* (١٢،١١)، كذلك استخدمت Suleiman and Altaee (١٣) و Suleiman (١٤) هذه الصبغة لتشخيص طفيلي *Babesia spp.* وذكرت الباحثة فائدة هذه الصبغة في الدراسات الوبائية والمسحية. طورت تقنية جديدة لتشخيص بيوض الديدان الإسطوانية اعتمدت هذه الطريقة على ارتباط الحامض النووي الريبوزي المنقوص الأوكسجين الموجود في غشاء البيضة مع مادة اللكتين ويكشف عنها باستخدام صبغة الفلورسين (١٥) وتعرف مادة اللكتين بانها معقد بروتين سكري (١٦)، حيث يتكون عند تفاعل البيوض معقدًا يكشف عنه باستخدام صبغة الفلورسين ويكون كل نوع من بيوض الطفيليات نوعاً خاصاً من مادة اللكتين معين الذي يرتبط به لذلك تعتبر هذه الطريقة من الطرق الخاصة للكشف عن البيوض وتعطي هذه الطريقة نتائج عالية الدقة وعادة تعتمد شدة الاضطراب بالفلورسين على كمية اللكتين المتفلورة وعلى مدة التحضين (١٧)، يعد خمج الضأن بالديدان الإسطوانية من الأمراض المهمة لما تسببه من خسائر اقتصادية بليغة وخطيرة لمربي تلك الحيوانات في مختلف أنحاء العالم، منها نقص أوزان الحيوانات الخمجة وارتفاع كلف رعايتها وعلاجها فضلاً عن نفوق أعداد من تلك النعاج والحملان والموليد الحديثة كذلك من التأثيرات السلبية للديدان الإسطوانية على المضيف حدوث الإسهال والإنكاز وفقر الدم الشديد (١). لذا هدفت الدراسة الحالية الى تشخيص الخمج بالديدان الإسطوانية في الضأن وذلك بإجراء مقارنة بين طريقتين من طرق التشخيص الحديثة وهما صبغة الأكردين البرتقالية المتفلورة وعدة الصبغات الخاصة لصبغة اللكتين - فلورسين حيث استخدمت عدة الكت الجاهزة لتصبغ بيوض الديدان الإسطوانية.

المواد وطرق العمل

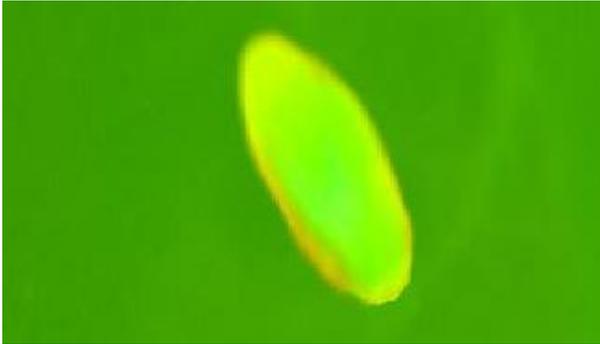
تحضير الشرائح الزجاجية

جمعت ٥٠ عينة براز من الضأن من مناطق مختلفة من محافظة نينوى منها (كركلي، الرحمانية، تليفي، الحمدانية، باب شمس، حاوي الكنيسة، ربيعة، تلعفر)، حيث جمعت العينات مباشرة من مستقيم الحيوانات باستخدام كفوف طبية ثم وضع البراز في قناني بلاستيكية معقمة، نقلت العينات الى المختبر وتم عمل مسحات من عينات من البراز على الشرائح الزجاجية وتركت الشرائح لتجف بشكل تام، ثبتت الشرائح باستخدام كحول المثيل المطلق لمدة دقيقتان وحفظت لصبغها لاحقاً (١٨،١٩).

صبغة الأكردين البرتقالية

حضرت صبغة الأكردين البرتقالية وذلك بإذابة ٢٠ ملغم من مسحوق الأكردين البرتقالية مع ١٩٠ مل من محلول داري الصوديوم اسيتيت ذو الدالة الحامضية ٣،٥ - ٤ والذي يتكون هذ

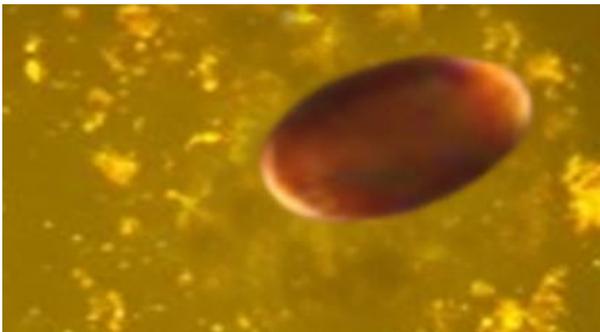
عالية (+++) مع اللكتين WGA (الشكل ١١). وأجريت المقارنة الإحصائية بين طريقة التصبيغ بالأكردين البرتقالية وطريقة التصبيغ بعدة اللكتين - فلورسين ولوحظ وجود فروقات معنوية بينها وكانت أفضل الطرق هي تقنية التصبيغ بطريقة التصبيغ بعدة اللكتين - فلورسين (الجدول ٢).



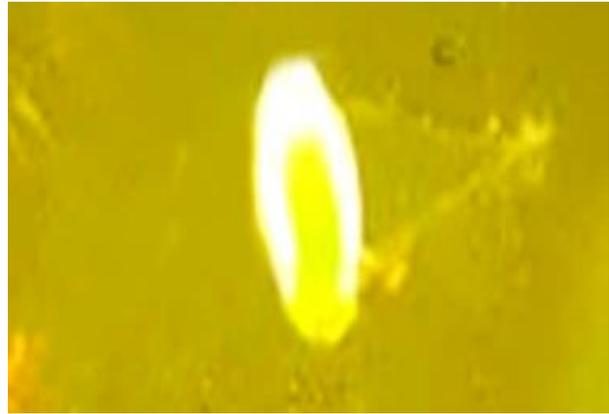
الشكل ٤: يوضح بيضة *Trichostrongylus spp.* باستخدام صبغة الأكردين البرتقالية المتفلورة، $\times 40$.



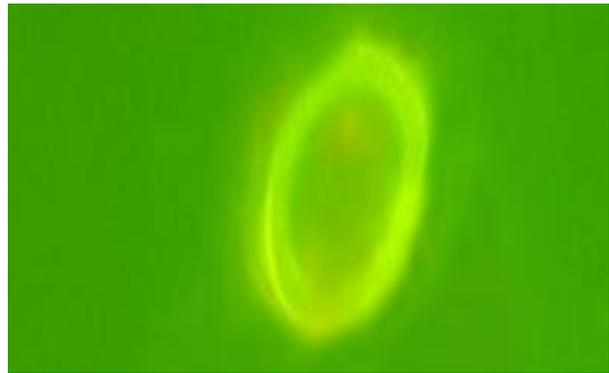
الشكل ٥: بيضة (*Trichostrongylus spp.* (PNA).



الشكل ٦: بيضة (*Trichostrongylus spp.* (RCA).



الشكل ٢: يوضح بيضة *Trichuris ovis* باستخدام صبغة الأكردين البرتقالية المتفلورة، $\times 40$.



الشكل ٣: يوضح بيضة *Ostertagia spp.* باستخدام صبغة الأكردين البرتقالية المتفلورة، $\times 40$.

شخصت ببيوض الديدان الإسطوانية عند استخدام عدة صبغة اللكتين فلورسين المتخصصة تشخيص ببيوض الديدان الإسطوانية بهذه التقنية فقد بلغت النسبة الكلية للدمج بهذه الديدان ٩٧٪ وقد احتوت هذه العدة على سبع أنواع من اللكتين الذي يرتبط بدوره بأنواع متخصصة من ببيوض الديدان الإسطوانية وتضمنت هذه اللاكتينات (SBA-RCA -PNA -DBA-CONA - UEA1 -WGA)، وتبين من الجدول ١ الارتباط القوي لبيوض *Trichostrongylus spp.* مع نوع اللاكتين Con A في حين كان ارتباطه اقل شدة (++) مع اللكتين من نوع RCA ولم ترتبط ببيوض الطفيلي مع الأنواع الأخرى من اللكتين (الشكلين ٥ و ٦)، وكان ارتباط ببيوض طفيلي *Nematodirus spp.* قوياً (++) مع اللكتين نوع DBA وكذلك اللكتين نوع UEA1 وكان ارتباطها ضعيف (+) مع اللكتين SBA (الأشكال ٧-٩)، في حين ارتبطت ببيوض *Haemonchus contortus* بقوة مع اللكتين PNA (الشكل ١٠)، وأخيراً ارتبطت ببيوض *Chabertia ovina* بشدة

الجدول ١: يبين أنواع اللكتين وشدة ارتباطه مع أنواع بيوض الديدان الإسطوانية

<i>Chabertia ovina</i>	<i>contotus Haemonchus</i>	<i>Nematodirus spp.</i>	<i>Trichostrongylus spp.</i>	اللكتين (Lectin)
-	-	-	+++	(Concavaline A) CON A
-	-	+++	-	(Dolichous Biflorus A.) DBA
-	+++	-	-	(Peanut A.) PNA
-	-	-	++	(Ricinus Comminus A.) RCA
-	-	+	-	(Soya Bean A.) SBA
-	-	+++	-	(Ulex Europaeuslec A.) UEA I
+++	-	-	-	(Wheat Germ A.) WGA

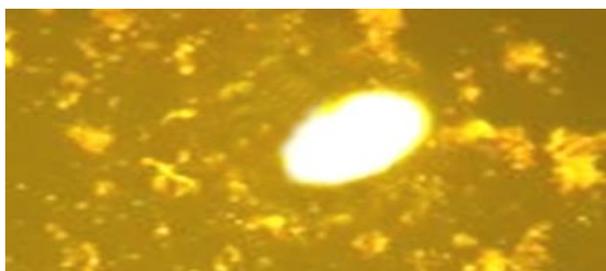


الشكل ٩: بيضة *Nematodirus spp.* (SBA).



الشكل ٧: بيضة *Nematodirus spp.* (DBA).

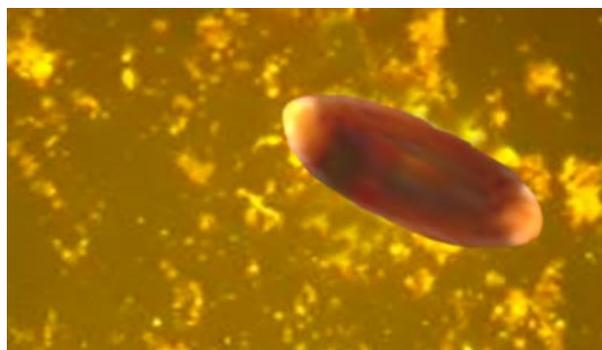
الشكل ١٠: بيضة *Haemonchus contotus* (PNA).



الشكل ١١: بيضة *Chabertia ovina* (WGA).

الجدول ٢: يبين الفرق بين نسبة الخمج بين طريقة التصبغ بعدة اللكتين - فلورسين وطريقة التصبغ بصيغة الأكردين البرتقالية

عدد العينات الكلية	نسبة الخمج بعدة اللكتين - فلورسين	نسبة الخمج بصيغة الأكردين البرتقالية
٥٠	a %٦٤	b %٨٣



الشكل ٨: بيضة *Nematodirus spp.* (UEA I).



المناقشة

الدقة العالية في التشخيص فهي تغني عن تقنية زرع البراز بغية الحصول على اليرقات للاعتماد عليها في تشخيص نوع الديدان الإسطوانية.

الاستنتاج

تمتاز عدة الجاهزة للكيتين - فلورسين بدقتها وكفائتها وسرعتها في تشخيص بيوض الديدان الإسطوانية فهي تغني عن تقنية زرع البراز بغية الحصول على اليرقات للاعتماد عليها في تشخيص نوع الديدان الإسطوانية.

الشكر والتقدير

يقدم الباحثان بالشكر الجزيل لعمادة كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، العراق على دعمها المتواصل للباحثين من خلال توفير المختبرات العلمية، فضلا عن دور المستشفى التعليمي البيطري التابع للكلية من حيث توفير العينات المستخدمة في البحث كما نتقدم بالشكر الجزيل لجميع زملائنا من الأطباء البيطريين لإمدادهم لنا يد العون من خلال توفير العينات قيد الدراسة، كذلك نتقدم بالشكر والامتنان لعمادة كلية الطب، جامعة نينوى، العراق لتسهيل مهمتنا في البحث من خلال استخدام مجهر التآلق المناعي التابع لكليتهم.

المصادر

1. Bowman DD, Lynn RC, Eberhard ML. Georgi's parasitology for veterinarians. 8th ed. USA: Sanders Elsevier Science; 2003. 153-229p.
2. Gessner T, Mayer U. Triarylmethane and diarylmethane dyes in Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. New York: Wiley-VCH Weinheim; 2002. http://ki.se/sites/default/files/gorankronvall_as_staining_mini-review.pdf. doi: 10-1002/14356007.a27179
3. Hemavani N, Chitinis D, Dixit DS, Asolkar MV. Acridine orange stained blood wet mounts for fluorescent detection of malaria. Indian J Pathol Microbiol. 1999;42:125-128.
4. Keiser J, Utzinger J, Premji Z, Yamagata Y, Singer BH. Acridine orange for malaria diagnosis: Its diagnostic performance, its promotion and implementation in Tanzania, and the implications for malaria control. Ann Trop Med Parasitol. 2002;957:643-654. DOI: 10.1179/000349802125001834
5. Gainer JH. Demonstration of *Anaplasma marginale* with the fluorescent dye, acridine orange, comparisons with the complement fixation test and wright's stain. Am J Vet Res. 1961;22:882-886.
6. Kawamoto F. Rapid diagnosis of malaria by Fluorescence microscopy. Lancet. 1991; 337:200-202. doi.org/10.1016/0140-6736(91)92159-Y
7. Fripp PD, Mason PR, Super HA. Method for the detection of *Trichomonas vaginalis* using acridine orange. J Parasitol. 1975;61:966-967.
8. Levett PN. A comparison of five methods for the detection of *Trichomonas vaginalis* in clinical specimens. Med Lab Sci. 1980;37:85-88.
9. Shute GT, Sodeman TM. Identification of malaria parasites by fluorescence microscopy and acridine orange staining. Bull World Heal Org. 1973;485:591-596.

استخدمت تقنية التصبغ بصبغة الأكردين البرتقالية حيث بلغت نسبة الخمج الكلية بها ٧٥٪ وشخصت بهذه الطريقة بيوض أجناس متعددة منها *Trichostrongylus spp.* و *Ostertagia spp.* و *Trichuris spp.* و *Bunostomum spp.* و امتازت هذه الصبغة بسهولتها وسرعتها فلا يتجاوز وقت التصبغ بها خمس دقائق (٢٣،٢٢،١٠،٢)، كذلك اتفقت نتائجنا مع ما ذكرته كلا من Suleiman and Altaee (١٤) حيث استخدمت هذه الصبغة لتمييز النوع *B. bovis* الصغيرة الحجم و *B. bigemina* الكبيرة الحجم مع دراسة مواصفاتها الشكلية وهذا ما يتفق مع ما ذكره Tarimo (٢٤) كذلك استخدمت صبغة الأكردين البرتقالية المتقلورة في تشخيص طفيلي *Plasmodium spp.* المسبب للملاريا في الإنسان (٢٥،٦،٤)، وقد أشارت العديد من الدراسات الى كفاءة صبغة الأكردين البرتقالية في تشخيص الطفيليات الدموية مثل *Trypanosoma spp.* و *Microfilaria* و *Babesia spp.* في كل من الإنسان والحيوان (٢٣،٢٢). تبين عند استخدام عدة الجاهزة للكيتين - فلورسين وجود بيوض الديدان الإسطوانية حيث تم تشخيص أربعة أنواع من بيوض الديدان الإسطوانية المرتبطة باللاكيتين وتضمنت هذه البيوض الأنواع *Trichostrongylus spp.* و *Haemonchus contotus* و *Nematodirus spp.* و *Chabertia ovina* وشخصت هذه الأنواع بارتباطها باللاكيتين CON A -DBA -PNA -RCA -UEA I -WGA و عادة يرتبط اللاكتين CON A بقوة (+++) مع بيوض *Trichostrongylus spp.* ويكون ارتباط اللاكتين RCA بدرجة اقل (++) مع بيوض *Trichostrongylus spp.* ويرتبط اللاكتين PNA بقوة مع بيوض *Haemonchus contotus* واتفقت هذه النتائج مع نتائج (٢٦) في حين يرتبط اللاكتين AAL مع بيوض *Trichostrongylus spp.* (٢١)، وكانت هذه البيوض تجمع أنيا وتحضن مع اللاكتين لمدة ١٢ الى ٢٤ ساعة بدرجة حرارة الغرفة و عادة يقل الارتباط باللاكيتين اذا كانت العينات قديمة أو زادت مدة التخزين عن أربعة وعشرون ساعة وهذا يتفق مع ما ذكره Umaire (٢١)، ومع ما ذكره Nordbring (٢٧). ويرتبط اللاكتين DBA و UEA I بقوة (+++) مع بيوض *Nematodirus spp.*، في حين يكون ارتباط الطفيلي ضعيف مع كلا من RCA و SBA وقد تعزى الأسباب التي أدت الى اختلاف أنواع اللاكتينات المرتبطة بالبيوض الى عدم وجود نفس هذه السكريات على سطح البيوض أو يؤدي فقدان الفلورسين الى تثبيط اختراق اللاكتين لجدار البيضة وبالتالي لا يحصل ارتباط باللاكيتين (٢٨) وقد سجل الباحث Umaire (٢١) ارتباط نوع PTL II مع بيوض طفيلي *Nematodirus spp.* كما تبين من خلال هذه الدراسة ارتباط اللاكتين WGA بقوة مع بيوض طفيلي *Chabertia ovina* (+++) وتتفق هذه النتيجة مع ما ذكره Umaire (٢١) ونظرا للنتائج التي توصلنا اليها نشير الى أهمية استخدام عدة القياس الجاهزة في تشخيص بيوض الديدان الإسطوانية لما تمتاز بهذه الطريقة من

20. Lauer BA, Reller LB, Mirrett S. Comparison of acridine orange and gram stains for detection of microorganisms in cerebrospinal fluid and other clinical specimens. J Clin Microbiol. 1981;142:201-205.
21. Umair S, McMurtry LW, Knight JS, Simpson HV. Use of fluorescent lectin binding to distinguish eggs of gastrointestinal nematode parasites of sheep. Vet Parasitol. 2015;217:76-80. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.029>
22. Ravindran R, Lakshmanan B, Sreekumar C, Dohn L, Gomathinayagam S, Mishra A, Tewar AK, Raod R. Acridine Orange staining for quick detection of blood parasites. J Vet Parasitol. 2007;211:85-86.
23. Goldsmid JM, Rogers S. Preliminary report on the use of acridine orange O for the detection of *Babesia canis* in the blood. TST Cent Afr. 1977;232:35-36.
24. Tarimo DS, Mpembeni R, Kawawa H, Mshana TC. Appraisal of the acridine orange method for rapid malaria diagnosis at three Tanzanian district hospital. East Afr Med J. 1998;75:504-507.
25. Gay F, Boubacar T, Zanoni D, Danis M, Balnc AF. Direct acridine orange fluorescence examination of blood slides compared to current techniques for malaria diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90:516-518.
26. Hillrichs K, Schnieder T, Forbes AB, Simcock DC, Pedley K, Simpson HV. Use of fluorescent lectin binding to distinguish *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus* eggs third stage larvae and adult worm. Parasitol Res. 2012;110:449-458.
27. Nordbring B. Action of a nematode-trapping fungus shows lectin-mediated host-microorganism interaction. Nature. 1979;281:477-479.
28. Chaney A. Identification of internal parasites of sheep and goat [MSc thesis]. Houston: Honor College; 2012. 26 p.
10. Kong HH, Chung D. Comparison of acridine orange and giemsa stains for malaria diagnosis. Korean J Parasitol. 1995;334:391-394.
11. Yoon E, Vail E, Sann L, Brass J. New staining technique for diagnosing *Babesia* species. Amer J Clin Pathol. 2015;144(Suppl 2,1):228. doi.org/10.1093/ajcp/144.suppl2.228
12. Salih DA, El Hussein AM, Singla LD. Diagnostic approaches for tick-borne haemoparasitic diseases in livestock. J Vet Med Anim Heal. 2015;72:45-56.DOI:10.5897/JVMAH2014.0345.
13. Suleiman EG. Morphological and molecular study of *Babesia spp.* and isolation and diagnosis of tick vector in infected cattle in Mosul city [PhD dissertation]. Mosul: University of Mosul, College of Veterinary Medicine; 2018. 124-126 p.
14. Suleiman EG, Altaee AF. The possibility of using acridine orange compared to giemsa stain in the diagnosis of parasite *Babesia spp.* in cattle. J Vet Med Sci. 2019;33(2):1-7. doi.org/10.33899/ijvs.2019.153870
15. Silvestre A, Humbert JF. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. Exp Parasitol. 2000;95:271-276. doi.org/10.1006/expr.2000.4542
16. Hamid R, Masood A. A dietary lectin as disease causing toxicants. Pakistan J Nutri. 2009;3:293-303.
17. Colditz IG, Le LF, Hosse R. Use of lectin binding characteristics and identify gastrointestinal parasite eggs in faeces. Vet Parasitol. 2002;109:219-227doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00013-4
18. Foreyt WG. Veterinary parasitology: Reference manual. 5th ed. New York: Blackwell; 2001. 81-91 p.
19. Thienpont D, Rochette F, Vanparijs O. Diagnosing helminthiasis through coprological examination. Belgium: Janssen Foundation Beers; 1986. 30p.