دراسة وبائية وتشخيصية للإصابةبالمقوسة الكونيدية في مشايم النساء المجهضات وا ٍناث الماشية (الأغنام والماعز) في محافظتي صلاح الدين والانبار

مبدر عواد عبد ، شهاب احمد محمد

قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

(تاريخ الاستلام: 16 / 9 / 2012 ---- تاريخ القبول: 17 / 2 / 2013)

الملخص

أجريت الدراسة الحالية لغرض عزل وتشخيص المقوس الكوندي *Toxoplasma gondii* من المشايم المأخوذة من مصدرين . تمثل المصدر الأول بالنساء المجهضات في محافظتي صلاح الدين والانبار ، والتي توزعت بواقع 50 مشيمة من كل محافظة . أما المصدر الثاني فتمثل بإناث الماشية المجهضة (الأغنام والماعز) ومن نفس المحافظات أعلاهو بواقع 20 مشيمة للنعاج و 20 مشيمة للماعز من كل محافظة . كما تم العمل على إحداث الإصابةتجريبياً في الفئران المختبرية من سلالة Balb/C لبيان كفاءة الطريقة في تشخيص الإصابة فضلاً عن متابعة التغيرات النسجية الناتجة عن الإصابة .

شخصت الإصابة بالطفيلي في 39 مشيمة (78%) من 50 مشيمة لنساء مجهضات في صلاح الدين ، و35 مشيمة (70%) من 50 مشيمة لنساء مجهضات في محافظة الانبار. وشخصت الإصابة بالطفيلي في 16 مشيمة (80%) من 20 مشيمة لنعاج مجهضات في صلاح الدين و11 مشيمة (55%) من 20 مشيمة لنعاج مجهضات في محافظة الانبار. كما شخصت الإصابة في 10 مشيمة (50%) من 20 مشيمة لماعز مجهضات في صلاح الدين و 10 مشيمة (50%) من 20 مشيمة لماعز مجهضات في الانبار . ظهر من الدراسة الحالية أن طريقة الحقن ألخلبي في الفئران تعد طريقة كفوءة لتشخيص وا ٍحداث الإصابة تجريبياً بالمقوسة الكوندية . حيث تم تسجيل نسبة إصابة 100% في الفئران بعد حقنها في التجويف البريتوني بالطفيلي أعلاه .

وقد ظهرت الأكياس النسجية (للسلالة المعزولة قيد الدراسة) في أدمغة وقلوبو أكباد وطحال ورئات وكلى وأمعاء وقرنية العيون في الفئران المصابة مختبرياً وتراوح حجم الأكياس بين (4-50) مايكرون . وشوهدت الأطوار الحرة (الحوينات السريعة) عادة في الرواشح الخلبية للفئران خلال الفترة من (3 – 6) أيام بعد الإصابة . تمثلت التغيرات النسيجية بتنخر وارتشاح خلوي غير متخصص في الدماغ والقلب والكبد والطحال والرئة والكلى والأمعاء وقرنية العين ، وغالبا ما اقترنت آفات الدماغ الالتهابية بآفات مماثلة في قرنية العين .

المقدمة

يعد داء المقوسات *Toxoplasmosis* من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان anthropozoonic . يتسبب هذا الداء عن الخمج بطفيليات المقوسة الكوندية *Toxoplasma gondii* ، ويعد احد الأمراض الشائعة والواسعة الانتشار عالمياً . وقد وجد أن هناك زيادة كبيرة في أعداد الأشخاص المصابين بهذا الداء أو حاملي أضداد antibodies الطفيلي ، فضلاً عن انتشاره في الحيوانات الداجنة [1,2] . تعد المقوسات الكوندية من الاوالي الطفيلية التي تتطفل داخل الخلايا بصورة إجبارية obligate intracellular parasite [3] . ويتميز هذا الطفيلي بوجود ثلاثة مراحل مختلفة تمتلك كل منها القابلية على إحداث الخمج في الإنسان وحيواناته الداجنة ، وتتضمن هذه المراحل كل من الحوينات السريعة التكاثر tachyziotes والحوينات بطيئة التكاثر bradyzoites الموجودة داخل الأكياس النسيجية tissue cysts فضلاً عن مرحلة أكياس البيض oocysts [4,5,6] . إن الخمج بداء المقوسات قد يكون خلقيا congenital أو مكتسبا acquired . وترافق الإصابة العديد من الأعراض السريرية التي تتفاوت من دون السريرية sub clinical إلى خمج حاد عام generalized acute infection [7,6] . يحدث الخمج طبيعيا في الحيوانات آكلة العشب herbivorous والقو ارت omnivorous واكلة اللحوم carnivorous من الحيوانات ثابتة درجة الحرارة homoeothermic ، وتشمل الرتب جميعها من اللبائن وعدد من الطيور والزواحف . وتعد القطط والأنواع التابعة للعائلة السنورية Felidae المضائف النهائية الإجبارية الوحيدة لها [8,9] . ينتقل الخمج بطفيلي المقوسة الكوندية بطرائق عدة منها شرب المياه وتناول الخضراوات والفواكه الملوثة بأكياس بيض الطفيلي ، فضلا عن التعامل مع التربة الملوثة ببراز القطط المخمجة ، كما يمكن أن يحصل الخمج عند تناول الأكياس النسيجية الموجودة في لحوم وأنسجة المضائف الوسطية الطرية أو غير المطهية جيدا . وقد يحدث الخمج نتيجة لشرب الحليب غير المبستر والملوث بالحوينات سريعة التكاثر . فضلاً عن طريقة الانتقال المهمة والمتمثلة بحدوث الخمج عبر المشيمة translucently infection [10,11,12] . ينتقل الخمج أيضاً عن طريق الجهاز التنفسي باستنشاق أكياس البيض [13]. ومن الممكن أن يقوم ذباب النجاسة filth flies والصراصر cockroaches بحمل أكياس البيضة من براز القطط إلى موائد الطعام . كما تقوم ديدان الأرض earth worms بحركة أكياس البيض من براز القطط المدفونة إلى سطح التربة لتكون عندئذ جاهزة لإحداث الخمج [14].

إن الإصابة بداء المقوسات الولادي Congenital toxoplasmosis في الإنسان يؤدي إلى ظهور العديد من العلامات السريرية المتباينة منها الإجهاض أو التخلف العقلي mental retardation وفقدان البصر blindness ومـوه الـرأس hydrocephalus فضلاً عن حدوث بعض التشوهات الخلقية في الأطفال congenital anomalies [15,16] . أما في الحيوانات الداجنة ذوات المردود الاقتصادي فيلعب الطفيلي دورا هاما من خلال الاجهاضات الواسعة التي يسببها وخاصة بين النعاج إناث الماعز [17,18] . كما يسبب ولادة حملان ضعيفة تهلك بعد الولادة [19] .

يفتقر القطر إلى دراسات تتحرى عن واقع الداء في الحيوانات الاقتصادية باستثناء دراسة أولية [20] في الأغنام والماعز استهدفت تحديد واقع الداء في القطر من خلال المسح المصلي ومحاولة عزل الطفيلي ، والتي أشارت إلى نسبة الخمج العالية (84.5%) فضلاً عن دراسة [21] إذ سجلت نسبة الخمج بالطفيلي (38,70%)باستعمال اختبار التلازن الدموي غير المباشر .

استناداً إلى ماذكر أعلاه فقد هدفت الدراسة الحالية إلى :

عزل وتشخيص الطفيلي من المشايم البشرية إناث الماشية (الأغنام والماعز) ثم بعد ذلك الحقن في خلب الفئران المختبرية من سلالة Balb/C لغرض تتبع التغيرات النسجية الناجمة عن الخمج في كل من أدمغة الفئران وقلوبها وأكبادها وطحالها ورئاتها وكلياتها وأمعائها وقرنية العين .

المواد وطرائق العمل

استخدمت في الدراسة الحالية الفئران البيض من سلالة Balb/C بعد التأكد من خلوها من العاهات الظاهرة والأمراض والتأكد من سلامتها من داء المقوسات وذلك باستخدام اختبار لاتكس (Latex test).

قسمت الفئران المستخدمة إلى عشرة مجاميع وبواقع 5 إناث وأثنين من الذكور ، وتم تهيئة الظروف الحياتية الملائمة من تهوية وإضاءة ودرجة حرارة . وأخضعت الفئران للعناية والمراقبة اليومية المستمرة حتى موعد توالدها ، لأجل الحصول على الإناث المولودة بالأعمار والأوزان المطلوبة .

عينات الطفيلي

تم متابعة الجوانب الوبائية للإصابة بالمقوسة الكوندية ، وتم الحصول على عينات الطفيلي وذلك باستخدام المشايم المطروحة من حالات الإجهاض للنساء المراجعات إلى مستشفى تكريت التعليمي ومستشفى بيجي العام (في محافظة صلاح الدين) ومستشفى الرمادي والفلوجة العام (في محافظة الانبار) . كما تم الحصول على المشايم المطروحة من حالات الإجهاض بالنسبة للماشية في المناطق آنفة الذكر وذلك بمساعدة مربي الماشية أنفسهم . وقد تم جمع عينات المشايم المعزولة في حاويات بلاستيكية نظيفة ذات أغطية محكمة ، وجرى ترقيمها حسب تسلسل الحالات ألتأريخي .و أضيف إلى العينة محلول الملح الفسلجي تركيز 9,. . جلبت العينات إلى مختبر مستشفى بيجي لغرض التعامل معها وفق الجوانب قيد الدراسة الحالية .

طريقة عزل الطفيلي من المشيمة

خضعت عينات المشيمة لعدد من المداخلات لغرض عزل وتشخيص الطفيلي ، وذلك تبعاً لما ذكره

[22,6] فقد تم استخدام طريقة الفحص لعينات المشايم وكالآتي

الهضم بالإنزيم تربسين وتمت بإتباع الخطوات التالية :

1 ـ اختيار عينة نسيجية من كل مشيمة تراوح وزنها من 30 – 50 غم . تم تقطيع العينات إلى قطع صغيرة ، ثم تم هرسها ومجانستها بالمدق والهاون الزجاجي Pestle and mortar أو بالخلاط الكهربائي. مع إضافة كمية مساوية لها من الملح الفسلجي .

2 ـ تم هضم النسيج بإنزيم التربسين بتركيز 25% (بعد تحضير النسيج بواسطة محلول الملح الفسلجي وعند دالة حامضية 7.2) حيث خلط محلول النسيج المشيمي المتجانس مع حجم مساو من محلول التربسين لكل غرام من النسيج .

3 ـ حضن الخليط السابق في 37 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة في حمام مائي هزاز لإتمام عملية الهضم النسيجي .

4 ـ رشح الخليط بعد ذلك بتمريره خلال عدة طبقات من الشاش الطبي المعقم بهدف التخلص من القطع النسيجية الكبيرة .

5 ـ نبذ الراشح في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 2000 rpm لمدة عشر دقائق ولعدة مرات بعد سكب الرائق وإضافة محلول دارئ فوسفات الصوديوم (phosphate buffer saline) إلى الراسب .

6 ـ سكب الرائق وعلق الراسب في محلول الملح الفسلجي لإزالة آثار الإنزيم الهاضم .

7 ـ تم نبذ الخليط مرة أخرى كما في السابق وأعيد تعليق الراسب في 4-5 مل من محلول الملح الفسلجي المضاف إليه 1000 وحدة دولية من البنسلين و100 ملغم من الستربتومايسين Streptomycin للوقاية من التلوث الجرثومي .

8 ـ وعند الانتهاء من تحضير المعلق النسيجي لكل مشيمة حفظ في علب بلاستيكية سعة 50 مل وعند درجة حرارة 4^o وقبل الحقن في الفئران روعي اخذ قطرة أو قطرتين من المعلق وتحضيرها على شريحة زجاجية وصبغها بصبغة كمزا أو لشمان لغرض التحري عن الطفيلي وتشخيص أطواره المحتمل وجودها .

اختبار لاتكس للتلازن

جرى استخدام هذا الاختبار وذلك لكونه يمتاز بالسرعة والكفاءة [23] من اجل التأكد من سلامة الفئران المستخدمة (لأول مرة) من داء المقوسات المكتسب ،واستبعاداً لعلاقة ذلك بداء المقوسات الخلقي في حالة ظهوره في الأجيال اللاحقة . فضلا عن استخدام هذا الفحص لتأكيد الإصابة التجريبية بداء المقوسات في الفئران . حيث تم الكشف عن وجود الأضداد في مصول الفئران بعد الإصابة . جهز هذا الاختبار على هيئة عدة Kitتدعى Toxo cell latex إنتاج شركة اسبانية Bio Kit ، شكلت عدة الاختبار من المكونات التالية :

1 ـ كاشف لاتكس Latex reagent

2 ـ المسيطر الموجب Positive control

3 ـ المسيطر السالب Negative control

ولغرض تأكيد الإصابة التجريبية في الفئران ، تم سحب 05,. مل من المصل بواسطة الماصة الدقيقة Micropipette ووضعت على شريحة زجاجية خاصة ، ثم وضعت قطرة من كاشف اللاتكس بجانب قطرة المصل ، ثم مزجت القطرتان معا لمجانسة المصل والكاشف ، ثم فرش المزيج على الشريحة مع الاستمرار بتحريكها بشكل دائري لعدة دقائق أقصاها 4 دقائق .وقد عدت نتيجة الاختبار موجبة في حالة ظهور التلازن بشكل واضح ورؤيته بالعين المجردة أو مجهرياً وعند قوة تكبير X 10 .

الحقن في الفئران

اختير عشوائياً عدد من إناث الفئران الفتية بعد التأكد من خلوها من الاصابة بالمقوسة الكوندية باستخدام اختبار اللاتكس . قربت أوزان الفئران بين (25- 35)غرام وبعمر 6 – 8 أسابيع . وجرى حقن 1.0 0.5 – مل من عالق المشيمة (المحضر سابقاً) في التجويف الخلبي بعد تعقيم موقع الحقن باليود أو الديتول المخفف . استخدمت لهذا الغرض محاقن نبيذه قياس 2 مل . كما جرى عزل الفئران المحقونة حسب نوع المستخلص المشيمي المحضر من نساء مجهضات وماشية (أغنام وماعز) ومن كلا المحافظتين صلاح الدين والانبار ، وذلك بوضعها في أقفاص سجل عليها تاريخ ونوع المستخلص المشيمي المحقون .ثم جرى فحص الراشح البريتوني لهذه الفئران (يوميا وحتى اليوم السابع) بعد الحقن بعالق المشيمة المتجانس لغرض التأكد من اكتساب الفئران للإصابة وذلك بعد الكشف عن وجود الحوينات السر يعة . ولغرض انجاز ذلك قد تم حقن في التجويف البريتوني لهذه الفئران 2 – 5 مل من دارئ فوسفات الصوديوم (PBS) ، ثم سحب الراشح بعد فترة وجيزة ليخضع للفحص المجهري المباشر ، حيث تم فحص مسحة من الراشح الخلبي بعد صبغها بصبغة كمزا أو لشمان والكشف عن أطوار الطفيلي في المسحة [5] .

التقييم الحيوي Bioassay

حقن 1 مل من الراشح الخلبي للفئران المصابة تجريبياً في التجويف البريتوني للمجموعة الثانية من الفئران السليمة ومن ثم متابعتها بعد مرور أسبوعين أو ثلاثة أسابيع وفحص مصولها باختبار لاتكس التلازني لتشخيص فيما إذا كانت قد أصيبت أم لا ، فضلاً عن ملاحظة بعض العلامات المرضية المعروفة نتيجة الإصابة بالطفيلي من خمول أو هزال أو حدب البطن (وهي انتفاخ في جهة من البطن) أو موه الرأس أو ما يشابه هذيان الفأرة مع كبر حجم الرأس أو هلاك الفئران . كما تم تشريح الفئران وحقن عينات من أدمغة الفئران (بعد مجانستها) في فئران سليمة أخرى كمجموعة ثالثة للتحقق من الإصابة . وشار إلى النمط التشخيصي أعلاه [24,25,26] .

الاختبارات النسيجية المرضية

لغرض تتبع التغيرات النسيجية في الأعضاء المختلفة بعد الإصابة المزمنة أو الخلقية بداء المقوسات الكوندية في الفئران بعد الإصابة التجريبية ، تم تشريح بعض الفئران ونزعت بعض الأعضاء منها مثل (الدماغ والقلب والكبد والطحال والرئتين والكليتين والأمعاء وقرنية العين) لغرض الفحص النسجي . ثم جرى حفضها بمحلول الفورمالين تركيز 10% وبعد الغسل والتنكيز dehydration طمرت في شمع البرافين وقطعت إلى مقاطع (باستخدام جهاز المشراح Microtome) بسمك 7 – 10 مايكرون ، وصبغت المقاطع النسيجية بصبغة الهيماتوكسلين الايوسين Haematoxylin – eosin . بعدها فحصت وثبتت التغيرات النسيجية وصورت بالكاميرا المثبتة على المجهر من نوع Olympus [27] .

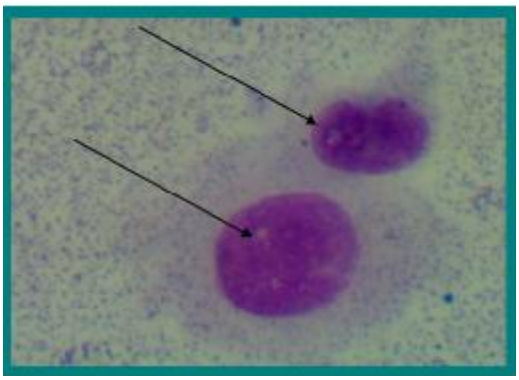
ألنتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن (39) مشيمة بشرية من أصل 50 كانت مصابة بالمقوسة الكوندية في محافظة صلاح الدين و35 مشيمة مصابة من أصل 50 في محافظة الانبار وبنسبة إصابة مقدارها 78% و 70% على التوالي جدول (1) . ووجد أن 16 مشيمة من أصل 20 في صلاح الدين و 11 مشيمة مصابة من أصل 20 في الانبار بالنسبة لمشايم النعاج المجهضات ، والتي شكلت نسبة اصابة مقدارها 80% و 55% ، على التوالي جدول (2) . ووجد أن 10 مشيمة مصابة من أصل 20 بالنسبة لمشايم الماعز المجهضة في كل من المحافظتين أعلاه والتي شكلت نسبة 50% جدول (3) . ، وذلك بالفحص ألمجهري المباشر لمسحة من عالق نسيج المشيمة المتجانس والمصبوغ بصبغة كمزا أو لشمان . وفي الدراسة الحالية لوحظ عند الفحص المجهري للمشيمة البشرية وجود أكياس نسجية مختلفة الأحجام ضمن عينة المشيمة الواحدة ، حيث تراوحت أحجام الأكياس النسجية بين 4 – 50 مايكرون (الصورة 2 ،3 ،4) . ويمكن تفسير ذلك على أساس تحطم الأكياس النسجية الساكنة وخروج الحوينات لتكوين أكياس فتية جديدة في خلايا المشيمة وأنسجتها ، مع ملاحظة انه قد يصل بعضاً من هذه الحوينات إلى الجنين عبر المشيمة . وهذا يؤكد إمكانية انتقال الخمج إلى الأجنة من أمهات مخمجة مسبقا حيث تتواجد أكياس نسجية ساكنة في أنسجة الرحم وبطانته endometrium والتي ستكون في تماس مباشر مع أنسجة المشيمة ، وفي حالة حدوث انفجار لتلك الأكياس (لأسباب متعددة) قد يعبر الطفيلي من أنسجة الرحم إلى المشيمة ثم إلى الجنين [28] . واستنادا إلى ذلك يمكن الاستنتاج في حالة تشخيص الطفيلي في المشيمة عند الولادة ، إن هنالك احتمالاً كبيراً من توقع خمج الجنين بالطفيلي ، لذا يجب في مثل هذه الحالات متابعة هؤلاء المواليد ذوي المشيمات المخمجة للتأكد من خلوهم من داء المقوسات وليتم بعكسه معالجتهم لتجنيبهم المضاعفات المرضية المعروفة لداء المقوسات الخلقي . وقد وجد أن معدل انتقال الخمج من الأم إلى الجنين هو 45% ، وان 60% من هؤلاء المصابين تكون حالتهم كخمج دون سريرية ، وان 9% منهم قد يموتون ، و 30% قد يعانون من تلف شديد في الدماغ والتهاب الشبكية المشيمي أو التخلف العقلي [14] . وقد لوحظ في الدراسة الحالية أن العديد من حالات الخمج المشخصة في المشيمات حصلت من ولادات طبيعية من نساء لم

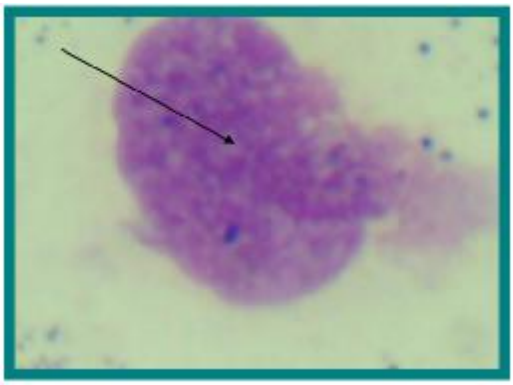
يدركن أو يساور أحدا الشك بإصابتهن . ومن البديهي أن يؤدي مثل هذا الخمج في الأمهات إلى توفير الفرصة لخمج الجنين خلقيا . وقد لا تظهر النتائج الخطيرة لهذه الخمج إلا بعد مرور سنين عديدة [14] . كما كشفت الدراسة الحالية أهمية المشيمة بوصفها احد المعايير المعتمدة والتي يجب اعتمادها مؤشراً لكشف الخمج الخلقي في حال عزل الطفيلي منها وتعذر تشخيصه بالطرائق الأخرى . وبينت نتائج التحليل الإحصائي باستخدام اختبار مربع كاي ( ) عدم وجود فروق معنوية بين (نساء صلاح الدين والانبار) عند مستوى معنوي o.o5 إذ كانت قيمة $^{n.s}$ (0.832=) . كذلك بينت نتائج التحليل الإحصائي باستخدام اختبار مربع كاي ( ) عدم وجود فروق معنوية بين (نعاج صلاح الدين والانبار) عند مستوى معنوي (o.o5) حيث كانت قيمة $^{n.s}$(2.849 =) في حين بينت نتائج التحليل الإحصائي باستخدام اختبار مربع كاي ( )عدم وجود فروق معنوية بين (ماعز صلاح الدين والانبار) عند مستوى معنوي (0,o5) حيث كانت قيمة $^{n.s}$(0.00=) . وجد من خلال تحليل نتائج الدراسة أن معدلات ألخمج في المشيمات المجهضة هي معدلات مرتفعة نسبياً ، مما يدل على انتشار الخمج بالطفيلي ، إذ مما لاشك فيه أن هذه المشيمات المخمجه تعكس الخمج المكتسبة بالطفيلي بين الإناث المجهضات من(النساء والماشية) اللواتي اكتسبن الخمج إما قبل الحمل أو خلاله . ولذلك شوهدت الأكياس النسيجية في المشيمة ومن المحتمل أن يكون هذا الخمج سبباً رئيسياً للإجهاض . كما انه ذلك ينطبق أيضا على المشيمات السالبة وبالرغم من عدم مشاهدة الطفيلي فيها لسبب أو لآخر . فهذا لا يعني خلوها من الخمج . ومن هنا يتضح أهمية المشيمة في تشخيص الخمج بالطفيلي . إن أسلوب مشاهدة الطفيلي في المشيمات عند الولادة يعد حتما من الوسائل التشخيصية المبكرة والمفيدة وتقنيتها سهلة وبسيطة . وعند التأكد من إصابة المشيمة يمكن المباشرة بالعلاج المناسب للمولود الجديد المشكوك في إصابته وفي الوقت الملائم للوقاية من الاعتلالات والمضاعفات التي قد تنتج عن داء المقوسات الخلقي الذي قد لا تشخص ولا تظهر أعراضه ونتائجه (كالتهاب الشبكية المشيمي للعين ، وفقدان البصر ، والتخلف العقلي ، والصرع ، والعوق بأنواعه) إلا بعد مضي سنين من الولادة . وقد ذكر [6] انه في حالة توقع وجود داء المقوسات الخلقي في الأطفال حديثي الولادة إما بسبب تشخيص الخمج الحادة في الأم والمكتسبة خلال فترة الحمل أو بسبب العلامات السريرية التي تبعث الشكوك على خمج الوليد فيجب عندها الاحتفاظ بقرابة 100غم من المشيمة بدون مثبت ولتحفظ في 4^{o} مئوية إلى حين حقنها في الفئران . ولذلك فقد اعتبر [6] إن حقن نسيج المشيمة في الفئران هي من الوسائل المفيدة جدا في تشخيص داء المقوسات الخلقي في الأطفال . واستناداً إلى النتائج المستخلصة من الدراسة الحالية ومن خلال مشاهدة الطفيلي في المشيمات يمكن الاستنتاج أن الأخذ بهذه الطريقة في تشخيص الطفيلي عند الولادة قد تكون مفيدة جدا وذات أهمية من الناحية الطبية والتقنية بوصفها إحدى أعمدة السيطرة للحد من الخمج بداء المقوسات . وبأتباع أسلوب الحقن في الحيوانات المختبرية فقد تم في الدراسة الحالية عزل الطفيلي وتشخيصه عن طريق حقن محتويات المشيمة المشكوك بها في التجويف الخلبي للفئران من سلالة Balb/c ، وقد وجد الخمج في كل المجاميع من الفئران المخمجة بأنواع المتخلص المشيمي في الدراسة الحالية وبنسبة 100% . وقد جاءت لتتفق مع النتائج التي توصل إليها الحيالي [29] في دراسته التجريبية على المقوسات الكوندية المعزولة من مشيمات النساء المجهضات والمحقونة في الفئران إذ بلغت نسبة الخمج 80% وتتفق الدراسة الحالية أيضاً مع نتائج الخشاب [30] والذي سجل نسبة خمج 82% ومن الواضح أن عزل الطفيلي وتشخيصه من المشيمة بطريقة الحقن في الفئران أعطت نتائج أفضل من طريقة الفحص ألمجهري المباشر . ويمكن أن يعزى ذلك إلى احتمال التشخيص المخطئ عند الفحص ألمجهري المباشر للعينات المصبوغة نظراً لقلة وجود أطوار الطفيلي (كالأكياس النسجية) وصغر حجمها ولا سيما في الخمج الحديثة ، وعلى العكس من ذلك فعند الحقن في الفئران حتى في حالة شدة الإصابة الواطئة وقلة أطوار الطفيلي فإنها سوف تتكاثر داخل الكائن الحي بالانقسامات السريعة المتكررة ويزداد عددها مما يعطي احتمالية اكبر بمشاهدتها. ولقد وجد أن الأطوار تنتشر في التجويف ألخلبي للفئران المخمجة مختبريا وان سرعة اقتحام Invasion هذه الأطوار لخلايا اللبائن تختلف بحسب سلالة الطفيلي .ولقد تم استخلاص عاملاً يرفع من قابلية الطفيلي لاختراق خلايا اللبائن ووجد ان هذا العامل يمتلك خصائص أنزيمية ويظهر انه يعمل على تحوير غشاء خلية المضيف ، وان الإنزيم serine protease ضروري جداً في عملية اقتحام الخلايا وللطفيلي قابلية النفوذ إلى الخلايا البلعمية وغير البلعمية إما بالاقتحام المباشر أو البلعمة حيث يبدأ بالتكاثر داخل هذه الخلايا كل 4-6 ساعات تقريباً وهكذا تزداد أعداد الحوينات السريعة مما يعزز من وجودها في الراشح ألخلبي للفئران المحقونة [22] وهكذا يسهل تشخيصها عند الفحص المجهري . كما عزل [31] المقوسات الكوندية بالطريقة نفسها من المشيمات ، وقد أشار إلى أن المقوسات الكوندية عزلت من 95% من المشيمات لأمهات مصابات بداء المقوسات . استناداً الى نتائج الدراسة الحالية يفضل استعمال هذه الطرائق عند محاولة عزل الطفيلي أو تشخيصه في المشيمات أو في أية أنسجة أخرى .وبناءاً على ماأعطته هذه الطريقة من نتائج مثمره فمن الممكن إيضاح ذلك من خلال المقاطع النسيجية لاعضاء الفئران المخمجة حيث لوحظ حدوث انتشار لمفي واسع في متن الكبد بشكل عقيدي Lymphatic nodules وبشكل منتشر Diffusion (صورة 4) كما وتوجد أعداد كبيرة من الخلايا الكبدية بشكل ضامر Atrophy ونوى الخلايا كبيرة الحجم حويصلية ، وظهور أعداد من خلايا كوفر البلعمية . كما ظهرت بعض الجيبانيات الدموية والاورقة المركزية وفيها احتقان دموي ومحاطة بالخلايا اللمفية ،و هناك بعض المناطق المحتوية على الطفيلي بشكل كيس فيه نوى كبيرة . كما لم يلاحظ

وجود انتظام لتوزيع الخلايا الكبدية في متن الكبد . أما المقطع النسيجي للدماغ (صورة 5) فلوحظ فيه وجود تنخر حبيبي granular necrosis لسايتوبلازم الخلايا الدماغية عند المنطقة الحبيبية والحبيبية الداخلية ، كما أن هناك تجاويف صغيرة الحجم في الطبقة ذاتها وتبدو قليلة النوى والتي يكون قد حصل لها تحلل nuclear karyolitic ، والطبقة متعددة الأشكال احتوت على أشكال تبدو ذات أكياس طفيلية بيضاوية الشكل مفرد ة أو بشكل ثنائي . وظهر من المقطع لنسيج الطحال (صورة 6) وجود أعداد هائلة جداً من الخلايا اللمفية في لب الطحال وبشكل كثيف بؤري ومنتشر focal and diffusion كما يلاحظ وجود عدد كبير من الطفيلي بشكل ابواغ كيسية ، وهناك انتشار للجيوب الدموية على شكل كتل من الخلايا اللمفية masses of lymphocytes .

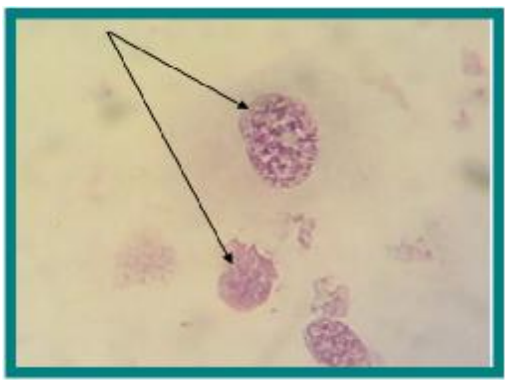
يظهر من الصورة (7) النسيج ألخلالي للرئة interstitial connective tissue وقد ارتشح فيه العديد من الخلايا اللمفية ، ولوحظ وجود عدد كبير من كريات الدم الحمراء في بعض الاسناخ الهوائية ، مع حدوث فرط دموي hyperemia في العديد من الأوعية الدموية في داخل الرئة ، ولو حظ وجود العديد من الخلايا البلعمية macrophages في النسيج ألخلالي لها . اما التغيرات النسجية للكلية (الصورة 8) فتمثلت وجود نزف دموي في الكبيبات متمثلاً بكريات الدم الحمراء على القمة الشعيرية للكبيبة وظهور حويصلات في الخلايا المبطنة للكبيبة فضلا عن ظهور فجوات في سايتوبلازمها مما يدل على حصول تحطم وتلف خلوي فيها وفي بطانة الخلايا المبطنة للشعيرات الدموية فيها . وتبين أيضاً وجود تنكس خلوي لبطانة النبيبات الملفوفة الدانية والقاصيةوظهر ت تجمعات لمفية عقدية عديدة في القشرة والنخاع ، كما ظهرت حول الأوعية الدموية والنبيبات الكلوية. ظهر في لب الكلية تلف للعديد من الخلايا المبطنة للنبيبات وعرى هنلي ومعظم الخلايا حصل لها انسلاخ في داخل تجاويف النبيبات . أما نسيج الأمعاء (الصورة 9) فظهر فيه الزغابات المعوية طويلة إصبعية الشكل finger like مبطنة بخلايا عمودية بسيطة وهناك تنكس في بعض هذه الخلايا وانسلاخ أعداد أخرى، و احتوى لب الزغابات على أعداد كبيرة من الخلايا اللمفية واحتوت قاعدة الزغابات على غدد مخاطية فيها عدد كبير من الخلايا المخاطية mucus cells ، كما ان الطبقة تحت المخاطية لوحظ فيها بعض الأوعيةالدموية المحتقنة و هي محاطة بعدد قليل من الخلايا اللمفية . وفيما يتعلق بنسيج القلبو التامور (الصورة 10) فقد احتوى على ارتشاح خلوي لمفي والتهابي وأكياس نسيجية tissue cysts احتو ى على بعض حزم الألياف العضلية القلبية . مع حدوث احتقان دموي في فروع الشرايين التاجية بين طبقات العضلات القلبية ، فضلا عن حدوث نزف دموي خارج الطبقة العضلية اي في منطقة التامور . ويظهر من الصورة (11) لمقطع من قرنية العين الطبقة المخاطية الداخلية للجفن فيها زيادة في كثافة عدد الخلايا الظهارية مع ارتشاح عدد من الخلايا اللمفية معها ، كما ظهر تنكس في بعض الخلايا الظهارية للقرنية مع حدوث انفصال في حزم الألياف الغروية التابعة للعدسة ، و أظهرت الغدد الدمعية ارتشاح لمفي والتهابي بين وحدات الإفراز الغدية مع امتلاء تجاويف الغدد براشح دمعي والتهابي . وتتفق نتائج الدراسة الحالية من حيث التغيرات النسجية التي حدثت على أعضاء الفئران المخمجة بأنواع المستخلص المشيمي آنفاً مع دراسة [29] في الموصل وتتفق نتائج الدراسة الحالية أيضا مع نتائج دراسة [30] في الموصل لنفس الغرض أعلاه.



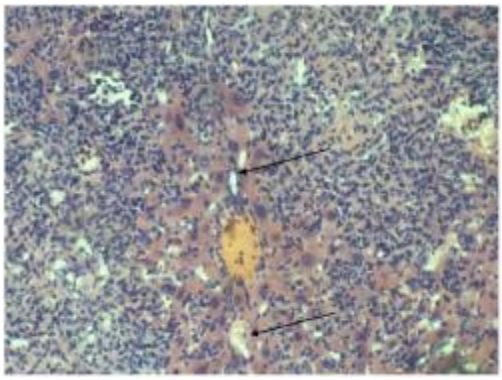
الصورة (1) صورة مجهرية للأكياس النسجية توضح الفرق بالحجم كما تشاهد في مسحة من عالق المشيمة (1000X) صبغة كمزا .



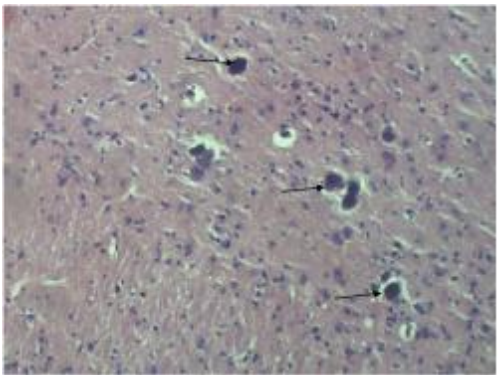
الصورة (2) صورة مجهرية للأكياس النسجية تظهر تحرر الحويصلات البطيئة التكاثر بعد تكسر جدار الكيس كما تشاهد في مسحة من عالق المشيمة (2000X) صبغة كمزا .



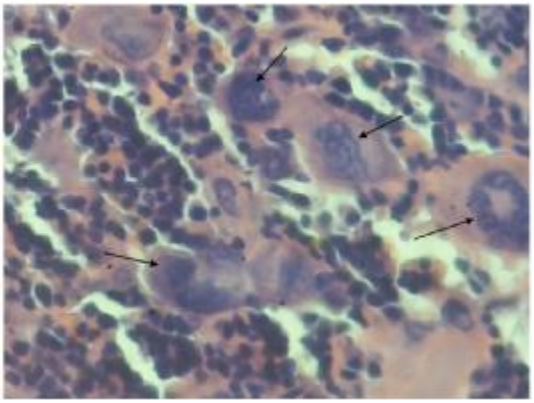
الصورة (3) صورة مجهريه للأكياس النسجية كما تشاهد في مسحة من عالق المشيمة (1000X) صبغة ليشمان



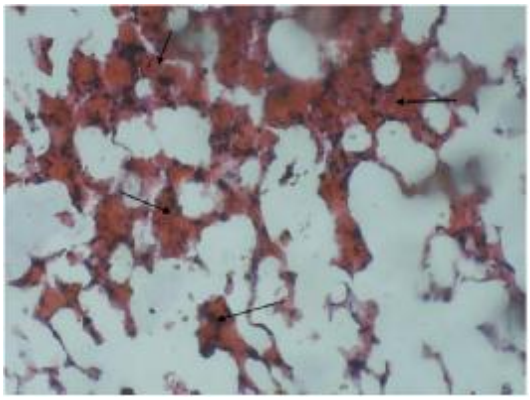
الصورة (4) تبين انتشار خلوي لمفي عقيدي الشكل في متن الكبد الصبغة هيماتوكسلين – ايوسين 20X



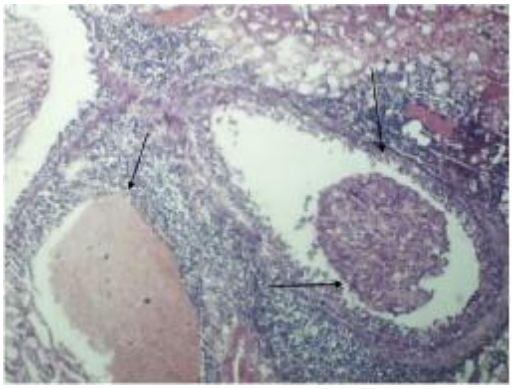
الصورة (5) تبين أكياس بوغية طفيلية في نسيج الدماغ الصبغة هيماتوكسلين – ايوسين 20X



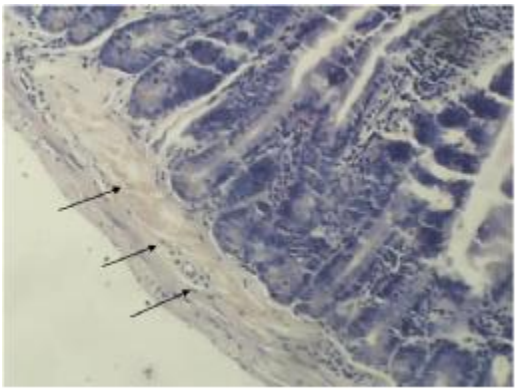
الصورة (6) تبين أكياس بوغية طفيلية في متن الطحال الصبغة هيماتوكسلين – ايوسين 40X



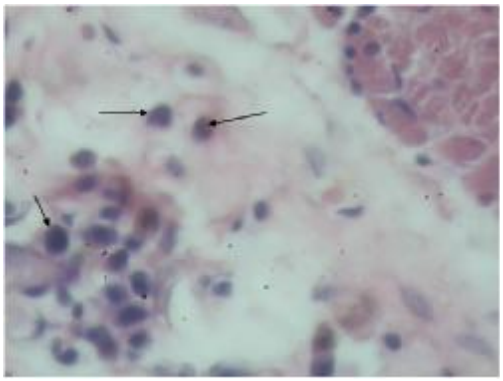
الصورة (7) تجمع كريات الدم الحمراء في تجاويف الاسناخ للرئة الصبغة هيماتوكسلين – ايوسين 20X



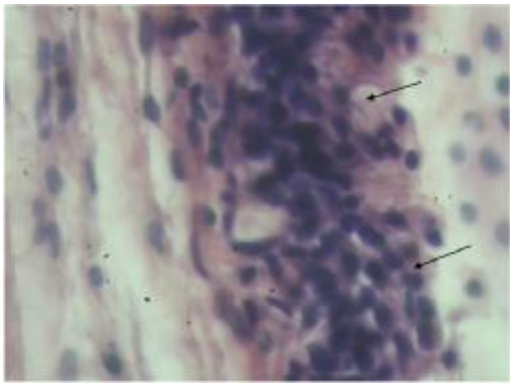
الصورة (8) تبين تجمع لمفي عقيدي مستمر في القشرة ولب الكلية الصبغة هيماتوكسلين – ايوسين 20X



الصورة (9) تبين ارتشاح لمفي كبير حول قاعدة الزغابات في الأمعاء الصبغة هيماتوكسلين – ايوسين 20X



الصورة (10) تبين ارتشاح خلوي لمفي التهابي مع طفيلي toxoplasma عند تامور القلب الصبغة هيماتوكسلين – ايوسين 20X



الصورة (11) توضح كثافة الخلايا الظهارية لقرنية العين وتنكس بعض خلاياها الصبغة هيماتوكسلين – ايوسين 40X

جدول (1) تشخيص الخمج بداء المقوسات في المشيمات المأخوذة من النساء المجهضات في محافظتي صلاح الدين والانبار

	مجهضات صلاح الدين	مجهضات الانبار	Total
Positive	39(78%)	35(70%)	50
Negative	11(22%)	15(30%)	50
Total	50	50	100

χ^2 =(0.832) n.s

جدول (2) تشخيص الخمج بداء المقوسات في المشيمات المأخوذة من الأغنام المجهضات في محافظتي صلاح الدين والانبار

	مجهضات صلاح الدين	مجهضات الانبار	Total
Positive	16(80%)	11(55%)	20
Negative	4(20%)	9(45%)	20
Total	20	20	40

χ^2 =(2.849) n.s

جدول (3) تشخيص الخمج بداء المقوسات في المشيمات المأخوذة من الماعزالمجهضات في محافظتي صلاح الدين والانبار

	مجهضات صلاح الدين	مجهضات الانبار	Total
Positive	10(50%)	10(50%)	20
Negative	10(50%)	10(50%)	20
Total	20	20	40

χ^2 = (0.00) n.s

المصادر

1. Wilson, M. and McAuley, J. B. (1999). *Toxoplasma* In : Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C. and Yolken, R.H. "Manual of Clinical Microbiology". 7th ed. American Society for Microbiology, Washington., 1374-1382.
2. Nuhoglu, S., Kaya, D. and Kaya, E. (2001) . Investigation of *Toxoplasma* antibodies in cord sera of healthy neoborn infants. Turk. Parasitol. Derg., 25(4): 329-331.
3. Subauste, C., and Remington, J. (1998).Animal model for Toxoplasma gondii infection in : Current protocols in immunology . John Wiley, Sons, Inc. PP. 1931- 1938.
4. Dubey, J.P. (1998a). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol, 28:1019-1024.
5. Dubey, J.P. (1998b). Re-examination of resistance of *Toxoplasmo gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. Parasitology, 116:43-50.
6. Remington, J.S.; McLeod, R.; Thulliez, P. and Desmants, G. (2000). Toxplasmosis. In: Remington, J.S. and Klein, J.O. (editors). "Infectious Diseases of the fetus and Newborn Infant". 5th W.B. Saunders Co. Philadelphia: 206-346.
7. Luft, B.J. and Remington, J.S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. J. Clin. Infect. Dis., 15:211-222.
8. Luder, C.G.K. and Gross, U. (1998). Toxoplasmosis: From clinics to basic science. Parasitol Today, 14:43-45.
9. Striepen, B.; Grawford, M.; Shaw, M.;Tilney, L.; Seebers, F. and Roos, D. (2000). The plasted of Toxoplasma gondii divided by association with the centrosomes. Cell. Biol, 151:1423-1434.
10. Brito, AF, Souza, L.C. Silva, A.V, Langoni, H. (2002). Epidemiological & serological aspects in canine Toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97 (1) : 31 – 35.
11. Figueiredo, J. Silva, D.A, Cabral D, Mineo, J. (2001) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goat indirect heamagglutination, Immunoflurescence and immunoenzymatic tests in the region of unberlandia, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 96 (5) : 687 – 692.
12. Hiramoto, R.M, Borges, M.M, Galisteo, A.S, Meireles, L.R, Macre, M.S, Radem, H.F. (2001). Infectivity of cysts of the ME–49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk & homemade chess. Rev. Saude. Publica. 35 (2) : 113 – 118.
13. Bagley, C.V. (2001). Infectious reproductive diseases of small ruminants. J. Infect. Dis. 31: 162 – 171.
14. Roberts, L.S. and Janovy, J. (1996). Foundation of parasitology. 5th ed., London, C. Brown, pp. 121-135.
15. Guimaraes, A.C., Kawarabayashi, M., Borges, M.M., Tolezano, J.E., Andcae, and Jonior, H.F (1993). Regional variation in Toxoplasmosis seronegativity in the Sao Paula Metropolitan region. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo., 35: 479 -483.
16. Acebes, M.N. Diez, B., Rodriguez, J.A.G., Viens, P.,and Cisterma, R. (1994). Detection of circulating antigens in the diagnosis of acute toxoplasmosis Am. J. Trop.Med. H y g . 51 (4) : 506 – 514.
17. Beverley, J.K.A. and Watson, W.A.(1961). Ovine abortion and toxoplasmosis in Yorkshire. Vet. Rec., 73: 6 – 11.
18. Hartley , W.J. and Marshall , S.C. (1957) . Toxoplasmosis as acause of ovine perinatal mortality . N.Z. Vet. J. 5: 119 – 124 .
19. Jacobs , L . and Hartley , W . J . (1964). Ovine toxoplasmosis studies on parasitaemia , tissue infection and congenital transmission in ewe infected by various routes . Br. Vet. J., 120: 347 – 364 .
20- رشيد ، رافده نعمان (1984) . عزل طفيلي مقوسات كوندي والتشخيص المصلي لداء المقوسات . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد .

21- مهدي ، علي جعفر (1988) . دراسة مصلية وبائية لداء المقوسات في الأغنام في العراق . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد.

22. Dubey, J.P., Lindsay, D.S. and Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts . Clin. Microbiol . Rev., 11(2): 267 – 299.

23 - الخفاف ، فرح حازم عمر ، (2001) . عزل ودراسة وبائية مصلية لداء المقوسات في النساء بسن الإنجاب في محافظة نينوى . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل .

24. Dubey, J.P. and Frenkel, J.K. (1972). Cyst-induced Toxoplasmosis in cats. Journal of Protozool., 19:155-177.

25. Freyre, A. (1995). Separation of Toxoplasma cysts from brain tissue and liberation of viable bradyzoites. J. Parasitol., 81(6): 1008-1010.

26. Freyre, A., Falcon, J., Correa, O., El-Elho, S., Mendez, J. and Gedda, C. (1999). Congenital transmission of experimental toxoplasmosis in rats. J. Parasitol.,85(4):746-748.

27. Luna, L.G. (1968). "Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology". 3rd ed., McGraw Hill Book Co. New York, 38-76.

28. Guyton, and Hall ,(2006). Medical Physiology, International Edition, Elsevier Saunders, 11th Edition, page 1130.

29- الحيالي ، صباح سعيد محمود أحمد ،(2002). دراسة تجريبية على عزلات المقوسات الكوندية من المشيمات البشرية وتقييم كفاءة عدد من المضادات الحيوية في علاجها المستحدث في الفئران/ محافظة نينوى، أطروحة دكتوراه/فلسفة، كلية العلوم ، جامعة الموصل.

30- الخشاب ، فراس محمد بشير، (2010). مقارنة لتشخيص الخمج بالمقوسات الكوندية بين النساء لمجهضات والولودات طبيعيا" مع دراسة للتغيرات النسجية المتسببة عن الخمج ، أطروحة دكتوراه ، كلية التربية ، جامعة تكريت.

Epidemiological and Diagnostic study of infection with *Toxoplasma gondii* in placenta of aborted women and female of animals (sheep and goats) in Salah Al din and Al Anbar provinces

Mobdir Awad Abid , Shehab Ahmed Mohammed

Department of Biology , College of Education , Tikrit University , Tikrit , Iraq

(Received: 16 / 9 / 2012 ---- Accepted: 17 / 2 / 2013)

Abstract

The recent study has been accomplished to diagnoses *Toxoplasma gondii* from placenta which are taken from two sources. The first one is represented by the aborted women from Salah- Al- Deen and Al-Anbar governorates that are distributed as 50 placenta as from each governorate. As for the second source, it is represented by the aborted female from cattle (sheep and goats), from the same governorates, the samples are 20 placenta for sheep and 20 ones for goats from each governorates. In addition, the infection was made experimentally in mice of the mice Balb/c to identify the efficiency of the method in diagnosing the infection and by the virtue of checking the tissues changes.

The infection was diagnosed for parasite in 39 Placenta as (78%) from 50 placenta for aborted women in Salah Al- Deen and 35 placenta as (70%) from 50 placenta for aborted women in Al- Anbar governorate . It was also diagnosed the infection of parasite in 16 Placenta as (80%) from 20 placenta for aborted ewes in Salah Al- Deen and 11 placenta as (55%) from 20 placenta for aborted ewes in Al- Anbar governorate. There were also diagnosed infecion in 10 placenta as (50%) from 20 placenta for aborted goat in salah El din and 10 placenta as (50%) from 20 placenta for aborted goat in Al Anbar governorate. The current study showed that peritoneal cavity injected in mice is considered as the most efficient method to diagnosis and make the infection by such Toxoplasma gondii . That is, as an amount of (100%) of infection has been recorded in mice, after injecting them in peritoneal cavity with this parasite .

According to the observed Tissues cysts for the isolated strain in this study shows in brains , hearts , livers , spleens , lungs , kidneys , intestine and quarantine eyes of mice infected laboratory and the volumes of such tissue cyst are about (4-50) Micron . And seen to be eccentric free (tachyziotes) usually in the filtrates cavity to mice during the period from (3-6) days after infection. The histological changes include snort and infiltration cell which is not related to brain, heart, liver, spleen, lungs , kidneys , intestine and quarantine eyes and brain inflammatory lesions often accompanied with lesions like in the quarantine eyes.