التحري عن *Cryptosporidium parvum* و *Toxoplasma gondii* في بعض منتجات اللحوم والحليب

سماهر حازم سلطان النعيمي

كلية العلوم – جامعة الموصل

تاريخ تسليم البحث : 2010/10/25 ؛ تاريخ قبول النشر : 2010/12/23

ملخص البحث :

أجريت هذه الدراسة على عدد 45 عينة من منتجات اللحوم متمثلة في لحوم مفرومة وسجق مستورد ولنشون بواقع 15 عينة من كل نوع و 60 عينة من حليب الأبقار الطري والأغنام وتم فحص تلك العينات عن مدى تلوثها بالطفيليات الأولية التي تسبب أمراض للمستهلك نتيجة لتناول الغذاء الملوث وتم مناقشة المخاطر والأمراض التي تسببها تلك الطفيليات الأولية الممرضة على صحة المستهلك وكيفية منع تلوث منتجات اللحوم بتلك الطفيليات الأولية الممرضة.

Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Toxoplasma gondii* in some Meat and Milk Products.

Smaher Hazem S.N.

College of Science / University of Mosule

Abstract:

A total of 45 samples of minced meat, sausage and lunchen (15 of each) and 60 fresh milk samples from caws and sheep were examined for detection of protozoal food borne pathogens. *Cryptosporidium parvum* and *Toxoplasma gondii*, could by detected in varying percentages in the examined meat products. The public health significance of the detected protozoal food borne pathogens and the sources of contamination as well as recommendations to protect meat products from contamination with protozoal foodborne pathogens were discussed.

المقدمة: Introduction

يعد داء البويغيات الخبيئة Cryptosporidiosis من الأمراض الطفيلية المشتركة بين الإنسان والحيوان Zoonotic disease التي تسبب إسهالا شديداً، قد يكون خطراً بحيث يؤدي بحياة المصاب، خاصة في المرضى المثبطين مناعياً. يعد طفيل البويغيات الخبيئة من الطفيليات شديدة الخمجية، ويمكن الانتقال عن طريق الماء والطعام الملوثين بأكياس البيض المطروحة مع براز الإنسان والحيوانات المصابة فضلاً عن انتقاله عن طريق السباحة في البرك في الولايات المتحدة Huntor and Nichols (2003). ينتقل هذا الطفيلي بين الحيوانات والإنسان وبين الأشخاص عن طريق التلوث (Morrison,1998) يزداد انتقال المرض في المناطق الريفية لاحتكاك الإنسان مع الحيوانات وخاصة العجول والتي تعد المصدر الرئيس لإصابة الإنسان من خلال احداث تلوث في المياه المجهزة لهذه الحيوانات (Weir, 2001; Waters *et al.*, 2000) ويعد الصرصر من ضمن المضايف التي تنقل طفيل البويغيات الخبيئة فضلاً عن الطيور والجرذان والفئران الكيلاني (1998)، إن للذباب والخنافس دوراً مهماً في نقل اكياس البيض نقلاً ميكانيكياً Craczyk *et al.*, (1999).

وتعد الحيوانات البرية مثل القوارض والارانب واكلات اللحوم حيوانات خازنة للطفيل اذ تطرح اكياس البيض بدون ظهور علامات سريرية، وبذلك تسهم في تلوث البيئة Sturdee *et al.*, (1999).

أما بالنسبة لداء المقوسات Toxoplasmosis فيسببه طفيل *Toxoplasma gondii* وهو من الامراض الخطيرة التي تهدد المرأة الحامل وطفلها اثناء فترة الحمل. والطفل يحمل هذا المرض عن طريق الام حيث ينتقل اليه من خلال المشيمة وهو يهدد النساء الحوامل بالاجهاض المبكر او يسبب ولادات مشوهة (Frankel and Ruiz, 2000: المتيوتي، 2005) وينتقل هذا الطفيل إلى الانسان بواسطة تلوث الغذاء او الماء بأكياس الطفيلي وعن طريق الدم بين الام والطفل من خلال المشيمة.

المواد وطرائق العمل: Material and Methods

جمع العينات:

جمعت 45 عينة لحوم متمثلة بلحوم مفرومة وسجق مستورد ولنشون بواقع 15 عينة من كل نوع من اسواق مدينة الموصل وبعض اماكن بيع اللحوم المثرومة (القصابة). كما جمعت 60 عينة من حليب الابقار والاغنام الطري بواقع 30 عينة من كل نوع.

فحص العينات:

أ- فحصت عينات اللحوم للكشف عن وجود اكياس بيض طفيل C. parvum باستخدام طريقة المسحات المصبوغة بصبغة الزيل نلسن المحورة (Modified Zheil Nelsen) او ما يسمى بالصبغة الصامدة للحافظ Henriksen and Pohlenz, Acid fast stain (1981).

وكما يلي:

1- عملت مسحة خفيفة من اللحوم على شريحة زجاجية وتركت الشريحة لتجف دون استخدام اللهب.

2- ثبتت المسحة باستخدام الكحول الاثيلي المطلق لمدة 2-5 دقائق.

3- صبغت الشريحة بصبغة الكاربول فوكسين لمدة 15 دقيقة.

4- غسلت الشريحة بماء الحنفية.

5- اضيف حامض الكبريتيك بتركيز 2% ولمدة 20 ثانية.

6- ازيل الحامض بماء الحنفية.

7- صبغت الشريحة بصبغة الملاكايت الخضراء لمدة خمس دقائق والمحضرة باذابة 5 غم من الصبغة في 100 مل من الماء المقطر.

8- غسلت الشريحة بماء الحنفية وفحصت بعد جفافها تحت المجهر بقوة 40x ومن ثم تحت العدسة الزيتية 100x.

ب- فحص العينات للكشف عن الاكياس البيضية *Toxoplasma gondii*.

صبغة كيمزا Giemsa’s stain

تتألف من:

Glycerin 250 ml
Methanol 250 ml
Giemsa powder 3.8 gm

عينات الحليب الطري Fresh Milk

فحصت 60 عينة من حليب الابقار الطري والاغنام بالاعتماد على الطريقة التي ذكرها Deng and Cliver, (1999); Dubey *et al.*, (1980) وكالآتي:

- اخذت حوالي 20 مل من حليب الابقار الطري واضيف اليها نفس الحجم من الماء المقطر الحاوي على توين Tween 0.05% (T- H_2O) لإذابة الخلايا الدهنية.

- دور الحليب في جهاز المنبذة على سرعة 1000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق لترسيب اكياس البيض.
- أضيف الراسب 3 مل من (T-H_2O) واضيف المعلق إلى 10 مل من محلول شذر السكري ودور الحليب بجهاز المنبذة على سرعة 1000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق.
- أزيلت الطبقة العليا من المزيج بهدوء بواسطة ماصة باستور وغسلت بمحلول (T- H_2O) بإضافة 3 حجوم من المحلول نفسه إليها.
- فحص الراسب وعمل منه مسحة خفيفة وتركت لتجف ثم صبغت بالصبغات الخاصة بالكشف عن اكياس *Cryptosporidium parvum* *Toxoplasma gondii* .

عزل اكياس بيض طفيلي Cryptosporidium parvum

عزلت اكياس بيض الطفيلي حسب طريقة (Lazo *et al.,* 1986) من عشرة نماذج من عينات اللحوم (لحم مثروم وسجق ولنشون) المفحوصة سابقاً.

- غسلت عينات صغيرة من اللحوم وباستعمال جهاز المنبذة بسرعة 1000 دورة/ دقيقة ولمدة 5 دقائق، وفي كل مرة سكب الراشح واعيد رج الراسب بالماء المقطر.
- ثم مزج 5 مل من عينة اللحوم مع 7.5 مل من محلول السكروز 45% ودورت بجهاز المنبذة بسرعة 700 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة.
- جمع 20% من الجزء الصافي الذي يحتوي على عدد كبير من اكياس البيض ثم خفف بأربعة حجوم من الماء المقطر ودور بجهاز المنببذة بنفس السرعة والوقت السابقين واعيدت الخطوة السابقة مرتين على كل عينة.
- جمع الراسب واضيف له 100 مل من الماء المقطر وترك لمدة 60 دقيقة في حرارة المختبر لترسيب الجزيئات الكبيرة، وجمع بعدها الراشح ثم دور بجهاز المنبذة بسرعة 700 دورة/ دقيقة ولمدة 20 دقيقة.
- سحب الراشح واضيف إلى الراسب 20 مل من PBS محلول دارئ الفوسفات. ثم دور بجهاز المنبذة بسرعة 200 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة.
- اعيدت الخطوة السابقة إلى أن اصبح الجزء الراشح بشكل صافي.
- ثم غسل الراسب بمحلول توين Tween 20 بتركيز 0.01 %.
- ثم غسل الراسب عدة مرات بالماء المقطر.
- اجريت خطوات العزل بدرجة (4) مْ للحفاظ على اكياس البيض من التحطم.

وبعد كل عملية فصل اخذت قطرة من الراسب على الشريحة الزجاجية ووضعت عليها اكياس الشريحة وفحصت تحت المجهر للتأكد من وجود اكياس بيض الطفيلي.

- تم عد الأكياس لكل 1 مل من المعلق باستخدام شريحة تعداد كريات الدم Hemocyto mater.
- وتم حفظ اكياس البيض المعزولة والمنقاة في محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم. بتركيز 2.5 % وفي درجة حرارة (4) مْ لحين استعمالها لاحقاً.

تـأثير عمليتـي التجميـد والتـذويب فـي خمجيـة infectivity اكيـاس بـيض طفيلي *Cryptosporidium parvum*.

- استخدم معلق اكياس الطفيلي المعزولة من عينات اللحوم وبعد عدها كان المعلق يحوي على 1×10^{5} كيس بيضة/ 0.1 مل.
- وزع المعلق الحاوي على أكياس البيض على 4 انابيب زجاجية صغيرة الحجم 1 مل لكل انبوبة وغلقت بالورق الفضي.
- وضعت الأنابيب في التجميد على درجة حرارة بين (−20 إلى −25) مْ لمدة (0، 1، 4، 24) ساعة واعتبرت الانبوبة الأولى (0) كسيطرة.
- اخرجت الأنابيب من التجميد وتركت لتذوب في درجة المختبر.
- استخدمت فئران حديثة الولادة وبعمر 3−4 ايام وقسمت إلى 4 مجاميع بواقع 5 حيوانات لكل مجموعة باستخدام انبوب اللي الطري بقطر 0.6 نانوميتر وابرة قياس Gage (23 G) جرع كل حيوان 0.1 مل من المعلق الموجود لكل طبق ثم اعيدت الحيوانات إلى الامهات.
- في اليوم السابع من الخمج اجريت الصفة التشريحية للحيوانات حسب طريقة (Freire- sato setal, (1998. عزلت الامعاء وعرضت على جهاز الجانسة الكهربائية وتم عد اكياس البيض لكل 5 مل من معلق الامعاء المتجانس لتحديد مدى خمجية الاكياس أما العينة التي اعطت نتيجة سالبة بعد الأكياس دورت بجهاز المنبذة وصبغت بالصبغة الصامدة للحامض المحورة للتأكد من سلبية العينة.

النتائج والمناقشة:

الجدول (1)

النسب المئوية للحالات الموجبة في عينات اللحوم (مثروم، سجق، لنشون) المصابة بالـ ***Crptosporidium parvum*** **و** ***Toxoplasma gondii*****.**

الطفيليات Protozoa	لحم مثروم Miced meat N=15		سجق Sausage N= 15		لنشون Luncheon N=15	
	NO+ Ve	%	NO+ ve	%	NO+ Ve	%
Crptosporidium parvum	6	21	2	12	1	4
Toxoplasma gondii	2	7	4	14	1	4

من خلال الجدول (1) نلاحظ ان النسبة المئوية للاصابة باكياس البويغيات الخبيئة كانت 21% في اللحوم المثرومة و 12% في السجق و 4% في اللانشون ويتضح من الجدول إن اعلى نسبة اصابة بداء البويغيات الخبيئة كانت في اللحوم المثرومة والسجق وذلك لغياب درجات الحرارة اثناء الاعداد حيث ان اللحوم المثرومة تباع مباشرة للمشتري كذلك هو الحال مع السجق حيث لا تدخل الحرارة ابداً في اعداده وإنما يتم تعليبه مباشرة ويباع.

كذلك نلاحظ من الجدول إن نسبة الاصابة كانت منخفضة في عينة اللانشون وذلك لدخول درجات الحرارة اثناء اعداد اللانشون التي تحد من وجود الطفيلي فيه هذه النتائج جاءت مقاربة لما توصل اليه Harp *et al.*,(2000) ايضاً جاءت نتائج بحثنا هذا مقاربة لما توصل اليه الباحث Shaltout (2000) حيث اشار إلى امكانية انتقال طفيلي *Crptosporidium parvum* عن طريق منتجات اللحوم الملوثة اذ بلغت نسبة تواجد الطفيل في اللحوم المثرومة 20% وفي السجق 14% في حين بلغت في اللانشون 6%.

وقد ترجع النسبة المرتفعة لعينة اللحوم المثرومة إلى أن الذباب يلعب دوراً مهماً في نقل اكياس البيض نقلاً ميكانيكياً حيث لايخلو محل قصابة لبيع اللحوم واللحوم المثرومة من هذه الحشرات الضارة التي تسهم في تلوث البيئة.

نلاحظ من الجدول (1) ان نسبة الاصابة باكياس المقوسات الكوندية كانت مرتفعة في اللحوم المثرومة 7% والسجق 14% بينما كانت النسبة منخفضة في عينات اللانشون 4% ايضاً السبب يعود إلى غياب درجات الحرارة اثناء اعداد السجق واللحوم المثرومة بينما وجود الحرارة كعامل اساسي في اعداد اللانشون قلل من الاصابة بهذا الطفيل وهذه النتائج جاءت

مقارنة لما توصل إليه Frenken and Dubey and Miller (2005) حيث لاحظ وجود اصابة بداء المقوسات الكوندية في بعض عينات اللحوم.

الجدول (2)

النسبة المئوية للحالات الموجبة في عينات الحليب الطري للابقار والاغنام

الطفيليات Protozoa	حليب الابقار N= 30		حليب اغنام No=30	
	No + ve	%	No+ ve	%
Crptosporidium parvum	11	22	9	18
Toxoplasma gondii	0	0	0	0

من الجدول (2) كانت نسبة تواجد طفيلي *Crptosporidium parvum* 22% في حليب الابقار و 18 % في حليب الاغنام بينما لم نلاحظ وجود أي اصابة بطفيلي *Toxoplasma gondii* في العينتين فقد اشار Harp *et al.,* (1996) إلى ضرورة بسترة الحليب على درجة 71 مْ لمـــدة 10 ثانيـــة التـــي تكـــون كافيـــة لتحطـــيم خمجيـــة أكيـــاس بـــيض طفيلـــي Cryptosporidiun sp. .

جدول (3)

تقدير شدة الخمج لقياس اعداد الاكياس في امعاء الفئران الخمجة بالطفيلي

رقم الحيوان	مجموعة السيطرة Control	مدة التعرض بالساعات		
		1	4	24
1	5×10^5	4.66×10^5	1.25×10^5	0
2	5.5×10^5	4×10^5	1.5×10^5	0
3	5.7×10^5	4.7×10^5	0.8×10^5	0
4	5.2×10^5	5×10^5	1.3×10^5	0
5	6×10^5	4.7×10^5	1.2×10^5	0
المعدل ± S.E	**$5.5 \times 10^5 \pm (0.1)$**	**$4 \times 10^5 \pm (00.2)$**	**$1.2 \times 10^5 \pm (0.08)$**	**0**

أشارت النتائج إلى أن التجميد على درجة حرارة ما بين (−20 إلى – 25) مْ والتذويب لهما تأثير في خمجية أكياس بيض الطفيلي اعتماداً على فترة التجميد حيث أن درجة التجميد حتى ولو لوقت قصير تجعل جزء من الاكياس غير خمجة وبالتجميد الطويل تفقد خمجتها. فقد

لوحظ انخفاض في معدل الاكياس المحسوبة لكل 0.1 مل من الامعاء مع زيادة الفترة الزمنية للتجميد حيث كان معدل الاكياس (4×10^5 ، 1.2×10^5 ، 0) كيس بيضة/ 0.1 مل من الامعاء عند تعرضها للتجميد بأوقات (1 ، 4 ، 24) ساعة على التوالي. أما مجموعة السيطرة التي لم تتعرض فيها الاكياس إلى التجميد فقد بلغ معدل الأكياس (6.5×10^5 / 0.1 مل) من الامعاء.

وقد أشارت النتائج التي حصلنا عليها إلى أن التجميد بدرجة (−20 إلى −25) مْ ثم التذويب لهما تأثير في خمجية اكياس بيض الطفيلي اعتماداً على الفترة الزمنية التي تعرضت فيها للتجميد. وقد لاحظنا انخفاض في اعداد اكياس بيض الطفيلي المحسوبة في الامعاء مع زيادة الفترة الزمنية للتجميد، وكان معدل الاكياس صفر/ 0.1 مل من الامعاء عند تعرضها للتجميد لفترة 24 ساعة ثم تذويبها بعد وضعها في درجة حرارة الغرفة وهذا أدى إلى انعدام خمجيتها عند اعطاءها للحيوانات مما قد يشير إلى قتل أكياس بيض الطفيلي اثناء التجميد أو بقاءها مجمدة لفترة 24 ساعة أو عند تذويبها وهذا يتفق مع ما ذكره كلاً من Rossi *et al.*, (1990) a; semore and Watkins, (1999).

إن أكياس بيض *Cryptosporidium parvum* تفقد خمجيتها بالتجميد الطويل وعلى العكس من ذلك.

فقد درس Fujino *et al.*, (2002) تأثير درجات الحرارة العالية في خمجية أكياس بيض الطفيلي وذكر ان الاكياس تفقد خمجيتها عند تعرضها إلى درجة حرارة (55) مْ لمدة 30 ثانية و (60) مْ لمدة 15 ثانية و (70) مْ لمدة 5 ثانية.

المصادر

1. الكيلانـــــي، بـــان عبـــد الوهـــاب (1998)، دراســـة وبائيـــة داء الابـــواغ الخبيئـــة Cryptosporidiosis في بغداد، رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، بغداد، العراق.
2. المتيوتي، صدام سالم ياسين (2005)، تأثير السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *Escherichia coli* في الاستجابة المناعية للفئران البيض ضد الاصابة بداء الاكياس العددية، الثانوي، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.
3. Casemore, D. P. and Watkins, J. (1999). Review of disingection and associated studies on Cryptosporidium. Report prepare for the DETR Drinking Water Inspectorate. DETR. 56FP.
4. Deng, M.Q. and Cliver, D.O. (1999). *Cryptosporidium parvum* studies with diary products. Int. J. Food Microbiol., 46: 113- 121.
5. Dubey, J.P., Sharma, S. p. Lopes, C.w.G. Williams, J.F., Willisams, C.S.F., Weisbrode, S.E. (1980). Caprine Toxoplasmosis abortion, Clinical signs and distribution of Toxoplasma in tissues of goats fed Toxoplsma gondii oocysts. Am. J. Vet. Res., 41: 1072- 1076.
6. Frankel, J.K. and Ruiz, A. (2000): Endemicity of toxoplamosis in Costa Rica. Am. J. Epidemiol. 113: 254- 269.
7. Franken, J. K.; Dubey, J. P. and Miller, N.L. (2005): *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode Toxocara cati. Science 164: 432- 433.
8. Freire- Santos, F., vergara- Castiblance, C. A., Tojo- Rodriguez, J. L., Santamarina- Fernandez, T. and Ares-Mazas, E. (1998). *Cryptosporidium parvum*: An attempt at experimental infection in rainbow trout *Oncrohynchus mykiss*. J. Parasito., 84 (5): 935- 938.
9. Graczyk, T.K.; Cranfeild, M.R.; Fayer, R. and Bixler, H. (1999). House of flies, (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 61 (3): 500- 504.
10. Harp, J. A.; Fayer, R.; Pesch, B. A. and Jackson, G.J. (2000): Effect of Pasteuarization parvum oocysts in water and meat. Appl. Environ. Microbiol. 62 (8): 2866- 2868.

11. Harp, J.A., Fayer, R., Pesch, B.A. and Jackson, G. J. (1996). Effect of pasteurization on infectivity of *cryptosporidium parvum* oocyst in water and milk. Appl. Environ. Micobiol., 62 (8): 2866- 2868.

12. Henriksen, S. A. and Pohlenz, J. F. (1981). Staining of Crysposporidia by amodified Ziehl- Nelsen technique. Acta Vet. Scand., 22: 594- 596.

13. Hunter, P.R. and Nichols, G. (2003). Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients, Clin. Microbiol. Rev., 15 (1): 145- 154.

14. Lazo, A., Barriga, O. O., Rdeman, D.R. and Bech- Nielsin, S. (1986). Identification by transfer blot of antigens reactive in the enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) in rabbits immunized and a calf infected with Cryptosporidium sp. Vet. Parasitol., 21: 151- 163.

15. Morrison, L. (1998). Cryptosporidiosis. TAG: The OIReport.,: 1-9.

16. Rossi, P., Pozio, E., and M. G. Besse (1990). Crypopreservation of Cryptosporidium sp. Oocysts. Trans. R. Soc. Trop. Med., 84: 68.

17. Shaltout, F. A. (2000). Protozoal food borne pathogens in some meat 42 (84): 54- 59.

18. Sturdee, A. P.; Chalmers, R. M. and Bull, S.A. (1999). Detection of Cryptosporidium oocysts in wild mammals of manland Brit. Vet. Parsitol., 80: 273- 280.

19. Waters, W.R., Frydman, B., Marton, L.J., Valasinas, A., Reddy, V.K., Harp, J. A., Wannemuehter, M.J. and Yarlett, N. (2000). [N.N] biss (Ethyl)- cis- 6,7- dehydropermin: a new drug for treatment and prevention of *Cryptosporidium parvum* in fection of mic deficient in T- cell receptor alpha. Antimicrob. Agen. Chemother., 44 (10): 2891- 2894.

20. Weir. E. (2001). The Cryptic nature of Cryptosporidiosis. CMAJ., 164 (12): 1-5.