Assiut University web-site: www.aun.edu.eg

MICROSCOPIC AND MOLECULAR STUDY OF *BABESIA SPP. BABESIA BOVIS* AND *BABESIA BIGEMINA* IN MOSUL CITY-IRAQ

E.G. SULEIMAN AND A.F.ALTAEE
Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul-Iraq

Received: 26 July 2020; **Accepted:** 25 August 2020

ABSTRACT

The current study included examination of fifty blood samples which collected from both sexes and different ages of cattle in different areas of Mosul city, during the period from October 2017 to the end of November 2017 by using microscopical and polymerase chain reaction (PCR) techniques. The percentage of diagnosis of *Babesia spp*. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* by (PCR) 60% , 44%, 38% respectively , these percentage were higher than which recorded by microscopic examination 44%, 32%, 32% respectively. The results showed product of amplification on agarose gel 2%, 644, 350, 278 bp respectively, also this study showed that the alternative methods (not commercial) which used for extraction of DNA form the blood of cattle were evaluated as most efficient and obtained good concentration and purity of DNA which used in polymerase chain reaction and these methods characterized as most rapid, simple and dependable methods.

Key words: *Babesia spp, Babesia bovis, Babesia bigemina, cattle, PCR.*

دراسة مجهرية جزيئية لطفيلي *Babesia spp* و *Babesia bovis* و *Babesia bigemina* في الابقار في مدينة الموصل – العراق

ايمان غانم سليمان ، احلام فتحي الطائي
فرع الاحياء المجهرية – كلية الطب البيطري – جامعة الموصل – الموصل – العراق
Email: ahlaam.altaee@gmail.com Assiut University web-site: www.aun.edu.eg

تضمنت الدراسة الحالية فحص ٥٠ عينة دم جمعت من الابقار من كلا الجنسين ومن مختلف الاعمار ومن مناطق مختلفة في مدينة الموصل للمدة من بداية شهر تشرين الاول ٢٠١٧ ولغاية نهاية شهر تشرين الثاني ٢٠١٧ وذلك بكل من طريقة الفحص المجهري وتفاعل السلسلة المتبلر .

بلغت نسبة تشخيص طفيلي *Babesia spp* و *Babesia bovis* و *Babesia bigemina* بطريقة تفاعل السلسلة المتبمر ٦٠% و ٤٤% و ٣٨% على التوالي وهي اعلى من النسبة التي سجلت بطريقة الفحص المجهري ٤٤% و ٣٢% و ٣٢% على التوالي .

Corresponding author: A.F.ALTAEE
E-mail address: ahlaam.altaee@gmail.com
Present address: Department of microbiology, college of veterinary medicine, University of Mosul, Mosul-Iraq

ظهرت نتائج التضاعف على شكل حزم على هلام الاكاروز تركيز ٢% وبواقع ناتج تفاعل ٦٤٤ و ٣٥٠ و ٢٧٨ زوجا قاعديا على التوالي . كما اشارت الدراسة ان اتباع الطرائق غير التجارية (البديلة) في استخلاص الـDNA من دم الابقار قد اثبتت كفاءتها في الاستخلاص والحصول على تركيز وكمية مناسبة من الـDNA لاستخدامها في تقنية التفاعل التضاعفي (PCR) سلسلة الـ DNA اذ تعد من الطرائق السريعة والبسيطة والموثوقة لاستخلاص الـ DNA.

INTRODUCTION
المقدمــة

يعد مرض Babesiosis أو ما يسمى بداء الكمثريات Piroplasmosis أو حمى تكساس Texas fever أو مرض الماء الاحمر Red water disease أو حمى قراد الأبقارCattle tick fever واحدا من أهم الأمراض الطفيلية المنقولة بوساطة القراد الصلب وهو المسوؤل عن حدوث نسبة إصابات وهلاكات عالية في قطعان الأبقار في مختلف دول العالم (Bock *et al*.,2004). يسبب هذا المرض طفيلي يعود لجنس *Babesia* الذي يقع تحت شعبة Apicomplexa، صنف البوغيات Sporozoasida، رتبة Pirplasmida عائلة Babesiidae وان الأنواع الرئيسية التي تصيب الأبقار هي *B.bovis* و*B.bigemina* و*B.divergens* و*B.major* (OIE, 2013). يعد كل من *B.bovis* و*B.bigemina* من أكثر الأنواع امراضية وتأثيراً على صحة الأبقار وانتاجيتها (Chaudhry *et al.*, 2010) وان هذان النوعان لهما انتشار واسع في مناطق مختلفة من العالم في المناطق الاستوائية وتحت الاستوائية ولاسيما في أسيا وأفريقيا ووسط وجنوب أمريكا واجزاء من جنوب اوروبا واستراليا (Hamsho *et al.*, 2015) ويعد القراد نوع (*Boophilus*) *Rhipicephalus microplus* الذي يعود إلى عائلة Ixodidae الناقل الرئيس لهذين النوعين (Walker *et al.*, 2003).

تختلف شدة امراضية طفيلي *Babesia* باختلاف أنواعه إذ يعد النوع *B.bovis* اكثر ضراوة من النوع *B.bigemina*عموماً فان كلا النوعين يسببان مرضا سريريا وان الابقار التي تشفى من الإصابة تبقى حاملة للمرض وتصبح مصدرا رئيس لإصابة الابقار السليمة والمستعدة للاصابة . وتمتاز الأعراض السريرية في حالة الإصابة بالمرض بالحمى العالية وفقر الدم والبيلة الهيموكلوبينية والترنح وقد يحدث الإجهاض في الأبقار الحوامل واختزال الخصوبة في الذكور خاصة الثيران(Zulfiqar *et al.*, 2012, Bhata *et al.*, 2017) بشكل عام يشكل مرض Babesiosis اهمية كبيرة من بين الامراض الطفيلية في الأبقار وذلك بسبب تأثيره المباشر على الناحية الاقتصادية والانتاجية للابقار .تشخص الإصابة بطفيلي *Babesia spp.* بالاعتماد على العلامات السريرية وتاريخ المنطقة المرضي وانتشار القراد ويشخص الطفيلي مختبريا وذلك بعمل مسحات دموية خفيفة وثخينة وصبغها بصبغة الكيمزا ويعد هذا الفحص هو الفحص الذهبي والقياسي والسريع والروتيني ولاسيما في الإصابات الحادة ولكن ليس في الإصابات تحت السريرية والتي تكون فيها نسبة التطفل واطئة (Terkawi *et al.*, 2011, Demessie and Derso, 2015). وهناك طرائق اكثر دقة في تشخيص الإصابة بطفيلي *Babesia spp* عندما يكون مستوى التطفل واطئاً جداً في الدم مثل التقنيات الجزيئية Molecular Techniques ومنها تفاعل السلسلة المتبلمرPolymerase Chain Reaction (PCR) التي وصفت في تشخيص DNA للطفيلي في الأبقار الحاملة للإصابة وتحديد انواع *Babesia* في دم الحيوان وفي المراحل التطورية للطفيلي في القراد الناقل (Martins *et al.*, 2010).

استخدمت تقنية التفاعل التضاعفي لسلسة الـ DNA في تشخيص طفيليات *Babesia* وأشارت العديد من الدراسات والأبحاث إن تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الـDNA تمتلك حساسية وخصوصية عاليـة في التشخيص لطفيلـي *Babesia spp* في دم المضـيف الفقري والقراد الناقل وإن هذه التقنية لهـا القدرة على تحـديد الطفيلـي حتى في مستـوى التطفـل القليـل جداً وكذلك تحديد الحيوانات الحاملة للإصابـة التي تشكـل مصادر خازنة لإصابة الجهـاز الهضمـي للقـراد Fahrimal, *et al*., 1992, Figueroa, *et al.*, 1993, Smeenk, *et al.*, 2000, Figueroa, *et al.*, 1992, Oliveria, *et al.*, 2005 وأشار (Figuero, *et al.*, 1992) في دراسته إلى إن اختبار PCR يكون حساساً في تحديد إصابة الأبقار الكامنة بطفيلي *B.bigemina* .ذكر كل من (Fahrimal, *et al.*,1992) و(Calder *et al.*, 1996) و(Caccio, *et al.*, 2000) إن البادئات المستخدمة في تشخيص *B.bovis* تضخم من التسلسلات الجينية لكل من الجينات apocytochrome b و small subunit r RNA و B.tubulin وأشار (Calder *et al.*, 1996) بأن التضخيم من منطقة الجين mitochondrial apocytochrome b قد أظهر حساسية عالية من التضخيم من الجين SS r RNA لـ *B.bovis* كما إن البادئ المصمم من apocyto chrome b لا يظهر تفاعلاً مع الـDNA للمضيف وذلك عند تحديد الـDNA لـ *B.bovis* وعند استخدام البادئ المصمم من الجين B.tubulin لوحظ إنه يحتاج إلى إجراء طريقة nested PCR وذلك لتمييزه عن قطع الـDNA للمضيف (Caccio *et al.*, 2000). ونظرا لقلة الدراسات حول مدى الاصابة بطفيلي *B.bovis* و *B.bigemina* في الابقار في مدينة الموصل ولعدم وجود دراسات حول استخدام تقنية تفاعل السلسلة المتبلمر في تشخيص الاصابة بطفيلي *Babesia spp* اجريت هذه الدراسة.

MATERIALS AND METHODS
المواد وطرائق العمل

جمعت ٥٠ عينة دم ابقار وذلك من الحالات المرضية الواردة إلى المستشفى التعليمي لكلية الطب البيطري وكذلك من الحقول التابعة لمنطقة كوكجلي وذلك للمدة من بداية شهر تشرين الأول ٢٠١٧ ولغاية نهاية شهر تشرين الثاني ٢٠١٧. وقد جمعت عينات الدم من كلا الجنسين ومن مختلف الأعمار ومن حيوانات تعاني من علامات سريرية مميزة لداء Babesiosis ومن حيوانات تبدو سليمة سريرياً.

أخذت نماذج الدم بمقدار ٣-٥ مل من الوريد الوداجي بعد تعقيم المنطقة بالكحول الأثيلي ٧٠% باستعمال محاقن طبية نبيذة ومعقمة وحفظت عينات الدم في انابيب تحتوي على مانع تخثر نوع (K_3EDTA (5.4mg وحُركت قليلا لمنع حدوث تخثر للدم وسجلت البيانات الخاصة بكل عينة في استمارة خاصة تتضمن عمر وجنس الحيوان وتاريخ الجمع والمنطقة وهل الحيوان يعاني من علامات سريرية.

وحضرت مسحات دموية خفيفة وثبتت بالكحول المثيلي المطلق لمدة ٢-٣ دقائق وبعدها صبغت هذه المسحات بصبغة *May GrunwaldGiemsa* وفقا لعدة صبغة جاهزة (London).

التقنيات الجزيئية التي اجريت على عينات الدم وذلك للكشف عن الاصابة بطفيلي *Babesia spp* والنوعين *B.bovis* و *B.bigemina*

١- استخلاص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA من دم الأبقار
تم عزل الدنا من ٥٠ عينة دم الابقار وذلك بالاعتماد على الطريقة المحورة اليدوية من قبل (Iranpur and Esmailizadeh, 2010).

٢- قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين
باستخدام جهاز Biodrop التابع لكلية العلوم /جامعة الموصل/قسم علوم الحياة في مختبر البحوث الجزيئية وذلك بإضافة١مايكروليتر من الحامض النووي DNA المستخلص من العينات في الحفرة المخصصة للجهاز وسجل تركيز الحامض النووي المستخلص من عينات الدم ونقاوته(Viljoen *et al.*, 2005 $A_{260}nm / A_{280}nm$).

٣- فحص الـDNA على هلام الاكاروز
أجريت عملية الترحيل الكهربائي لعينات الـ DNA المستخلصة من الدم على هلام الاكاروز وفقا لـ Sambrook) (*etal*,1989وذلك باستخدام 2% من الاكاروز لترحيل DNA.

٤- ضبط تركيز DNA في العينات المدروسة كافة بالتخفيف بوساطة محلول TE
للحصول على التركيز المطلوب لإجراء تفاعلات الـ PCR وكان (٢٥) نانوغرام / مايكروليتر لكل عينة وذلك وفقا للمعادلة :

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

٥- التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA والمستخلص من الدم والخاصة بجنس *Babesia spp* والنوعين *B.bovis* و*B.bigemina*

١- تحضير البادئات Primers المستخدمة في التفاعل : البادئات مجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية وكما موضح في الجدول(١).

الجدول ١: يوضح البادئات مجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية.

المصدر	حجم الناتج Base pairs(bp)	تسلسل القواعد النتروجينية للبادئ الامامي والراجع	اسم البادئ الامامي Forward والراجع Reverse	Amount of oligo (nMole)	الجين الهدف Target gene
Figueroa *et al*,1993	350	F5'-CAC GAG GAA GGA ACT ACC GAT GTT GA-3'	92Figu1	11.3	*Rap 1 protein of B.bovis*
		R5'-CCA AGG AGC TTC AAC GTA CGA GGT CA- 3'	92Figu2	11.6	
Figueroa *et al*,1992	278	F5'-CAT CTA ATT TCT CTC CAT ACC CCT CC -3'	93 Figu 1	13.3	*Merozoite surface glycoprotein 45 (gp45)*
		R 5'-CCT CGG CTT CAA CTC TGA TGC CAA AG-3'	93Figu 2	12.6	
Figueroa *et al*,1992	644	F 5′ -GTG AAA CTG CGA ATG GCT CA-3′	Ibra 1	10.1	Small Subunit ribosomal RNA of *Babesia* common
		R5′-CCA TGC TGA AGT ATT CAA GAC-3′	Ibra 2	14.5	

٢- تحضير خليط التفاعل

أ- حضر خليط التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA وفقا للجدول(٢):

جدول ٢: يوضح خليط التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA

المكونات	الحجم النهائي ٢٠ µl
Prime Taq Premix (2X)	10 µl
Template DNA	4µl
Forward primer (10 picomole \µl	1µl
Reverse primer (10 picomole \µl	1µl
Deionized distal water	4 µl

عينة السيطرة الموجبة: عينة DNA مستخلصة من دم لحالات مرضية حادة جدا وذات نسبة تطفل عالٍ لكل من *B.bovis* و*B.bigemina* بلغت ١٧,٦% و٣٠,٢% على التوالي.

عينة السيطرة السالبة : تحتوي انبوبة PCRعلى كل خليط التفاعل ماعدا DNA المستخلص من دم الأبقار.

ب- مزجت جميع الانابيب بجهاز Microfuge على سرعة عالية لمدة ٣-٥ ثوانٍ لإتمام مزج مكونات التفاعل ويجب مراعاة وضع الانابيب داخل الثلج أثناء العمل.

ت- ادخلت أنابيب التفاعل في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler لإجراء التفاعل التضاعفي باستخدام البرنامج الخاص لكل تفاعل والمخططات التالية توضح البرنامج الخاص لكل نوع من البادئات المستخدمة في هذه الدراسة :

١- برنامج التفاعل الرئيس الخاص بجنس *Babesia spp* وذلك باستخدام البادئ المصمم بالاعتماد (Figueroa *et al.*, 1992) جدول (٣).

جدول ٣: يوضح برنامج التفاعل الرئيس الخاص بجنس *Babesiaspp*

Cycle	Temperature	Time	Stage
1	95ºC	3:00	المسخ الأولي لشريط الدنا Initial DNA denaturation
40 دورة التضاعف	93ºC	1:00	مسخ الشريط المزدوج DNA denaturation
	55ºC	1:00	ارتباط البادئ بالدنا القالب Primer annealing
	72ºC	1:00	استطالة البادئ Primer extension
1	72Cº	10:00	استكمال مرحلة الاستطالة Final extension
1	------	-----	Cooling

٢- برنامج التفاعل الرئيس للنوع *B.bovis* وذلك باستخدام البادئ المصمم بالاعتماد (Figueroa *et al.*,1993) (جدول٤).

جدول ٤: يوضح برنامج التفاعل الرئيس للنوع *B.bovis*

Cycle	Temperature	Time	Stage
1	90Cº	7:00	المسخ الأولي لشريط الدنا Initial DNA denaturation
35 دورة التضاعف	94Cº	1:00	مسخ الشريط المزدوج DNA denaturation
	55Cº	1:00	ارتباط البادئ بالدنا القالب Primer annealing
	72Cº	1:30	استطالة البادئ Primer extension
1	72Cº	10:00	استكمال مرحلة الاستطالة Final extension
1	------	-----	Cooling

٣- برنامج التفاعل الرئيس الخاص بالنوع *B.bigemina* وذلك باستخدام البادئ المصمم بالاعتماد (Figueroa *et al.*,1992) (جدول ٥).

جدول 5: يوضح برنامج التفاعل الرئيس الخاص بالنوع *B.bigemina*

Cycle	Temperature	Time	Stage
1	95Cº	3:00	المسخ الأولي لشريط الدنا Initial DNA denaturation
40 دورة التضاعف	93Cº	1:00	مسخ الشريط المزدوج DNA denaturation
	65Cº	1:00	ارتباط البادئ بالدنا القالب Primer annealing
	72Cº	1:00	استطالة البادئ Primer extension
1	72Cº	10:00	استكمال مرحلة الاستطالة Final extension
1	------	-----	Cooling

٤- بعد انتهاء التفاعل رفعت الأنابيب من جهاز المبلمر الحراري ثم سحب ٥ مايكروليتر من كل انبوبة PCR وحملت في هلام الاكاروز ٢% المحضر مسبقا مع الدليل الحجمي DNALadder.

٥- رحلت العينات وذلك بتشغيل جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis على فولتية ٥٠ ولمدة ساعة وذلك للتأكد من نجاح عملية التضاعف.

٦- وضع هلام الاكاروز في حوض يحتوي ماء مقطر مع بضعة قطرات من صبغة ايثيديوم بروميد وبكمية (٣٠٠ مل) ماء مقطر مع ٨قطرات من ايثيديوم بروميد ولمدة ٣٠ دقيقة وذلك لصبغ الحزم في حالة وجودها.

٧- وضع الهلام في جهاز الاشعة فوق البنفسجية لمشاهدة الحزم المصبوغة وملاحظة حزم نواتج التضخيم وصورت بالكاميرا الرقمية .

١- قُدرت الاحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة اعتمادا على موقع الحزم إذ قدرت بالمقارنة مع حزم الدليل الحجمي DNA Ladder.

RESULTS
النتـائـج

تبين من الدراسة الحالية وجود جنس *Babesia spp* بشكل عام والنوعين *B.bovis* و*B.bigemina* بشكل خاص في مدينة الموصل وذلك من خلال تشخيصها مجهريا وجينيا ولقد سجلت تقنية PCR نسبة تشخيص أعلى لجنس *Babesia* بشكل عام والنوعين *B.bovis* و*B.bigemina* مما سُجل في الفحص المجهري لمسحات الدم المصبوغة بالكيمزا وبلغت (٦٠% و٤٤% و٣٨%) على التوالي إذ تم تشخيص ٨ عينات كانت سالبة الإصابة بجنس *Babesia* و٦ عينات ظهرت سالبة الإصابة بالنوع *B.bovis* و٣ عينات ظهرت سالبة الإصابة بالنوع *B.bigemina* وذلك بالفحص المجهري وكما موضح في الجدول (٦) .

جدول ٦: يوضح عدد ونسب الاصابة بجنس *Babesia spp* والنوعين *B.bovis* و*B.bigemina* في 50عينة دم ابقار بكل من الفحص المجهري باستخدام صبغة الكيمزا وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل.

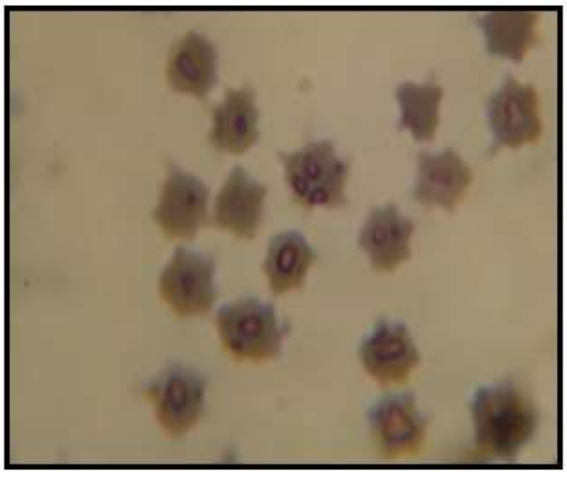
اسم التقنية	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات المصابة بجنس*Babesia spp* والنسبة المئوية	عدد العينات المصابة بالنوع*B.bovis* ونسبتها المئوية	عدد العينات المصابة*B.bigemina* ونسبتها المئوية
الفحص المجهري لمسحات الدم الخفيفة المصبوغة بصبغة الكيمزا	٥٠	a(%٤٤)٢٢	a(%٣٢)١٦	a(%٣٢)١٦
تقنية تفاعل السلسلة المتبلمر	٥٠	a(%٦٠)٣٠	a(%٤٤)٢٢	a(%٣٨)١٩

الاحرف المتشابهة تعني عدم وجود فرق معنوي وذلك عند مستوى معنوية P<0.05

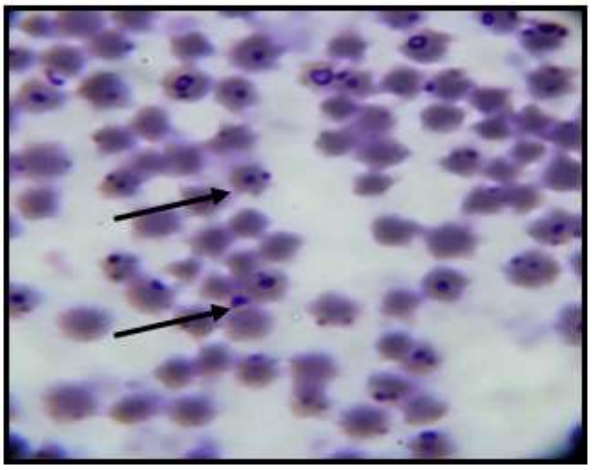
تبين من خلال فحص المسحات الدموية الخفيفة والمصبوغة بصبغة May GrunwaldGiemsa stain بتشخيص الإصابة بكل من طفيلي *B.bovis* و*B.bigamina* وذلك باستخدام العدسة الشيئية الزيتيةOil objective lens للمجهر الضوئي تحت قوة X100 ولقد تم تحضير مكررين من كل مسحة دموية وفحص ٢٠-٥٠ حقل مجهري لكل مسحة دموية لكي يُقرر هل ان الحيوان مصاب بالاوالي الدموية ام لا ولكن عند هذه القوة من تكبير المجهر كانت هناك سهولة في تمييز النوع.

شُخص *B.bigemina* بشكل مزدوج أو منفرد ومصطبغاً باللون الأزرق أو البنفسجي بشكل واضح جدا داخل الكريات الحمراء مع وضوح الكتلة النووية في كل جانب ويتراوح قياسه من ٣- ٥ مايكرون وكما موضح في الصورة وأيضا تميزت الاشكال الاخرى لهذا الطفيلي بسهولة وكما موضح في الصورة (١).

وأما ما يخص النوع *B.bovis* فلقد شُخص ايضا بقوة العدسة الزيتية الشيئية للمجهر الضوئي X100 وهو طفيلي صغير الحجم كمثري الشكل يتراوح حجمه من ٠,٥-٢,٥ مايكرون وظهر بشكل مزدوج مشكلا بذلك زاوية منفرجة وله كتلة نووية واحدة كما في الصورة (٢).

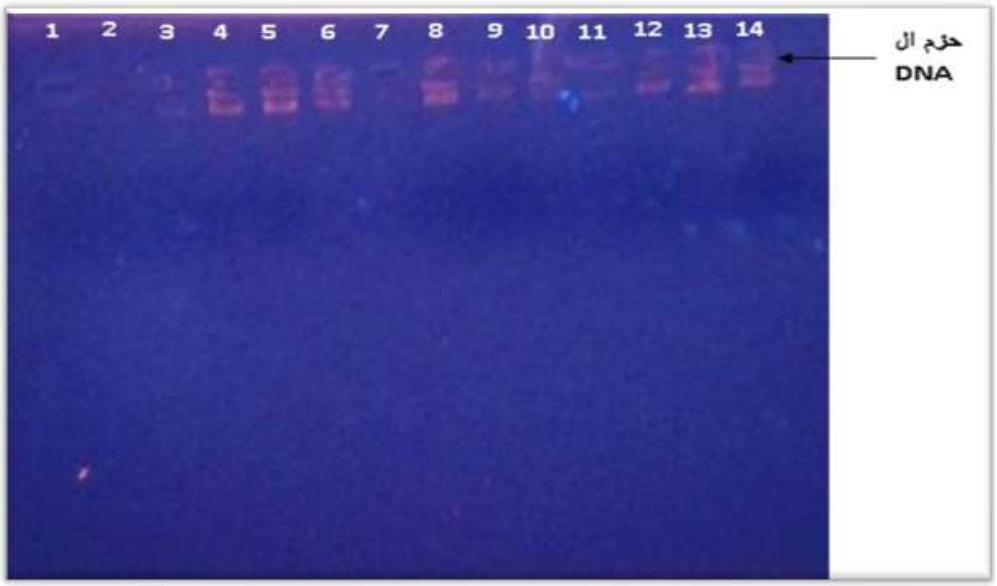


صورة 1: الشكل الكمثري والأشكال الأخرى لطفيلي *B.bigemina* بصبغة May GrunwaldGiemsa



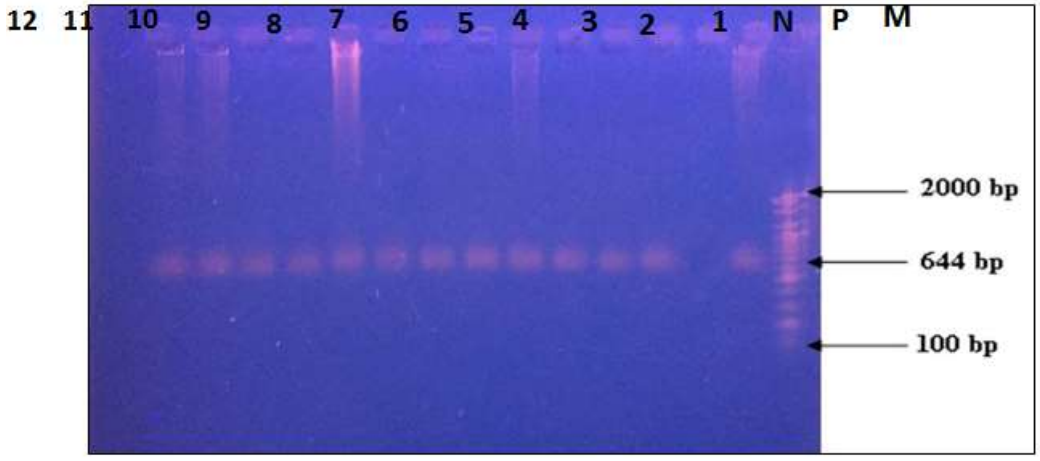
صورة 2: طفيلي *B.bovis* بصبغة May GrunwaldGiemsa قوة 100X وباستخدام الكاميرا الرقمية

توضح الصورة (3) حزم الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين الذي استخلص من 50 عينة دم أبقار من كلا الجنسين ومن مختلف الأعمار وبتركيز ٢٥نانوغرام / مايكروليتر في استخلاص الـDNA من الدم. تراوح تركيز DNA المستخلص من ٢٨,٠-٣٥٥,٧ نانوغرام / ماكروليتر وإن نقاوة الـDNA المستخلص تراوحت بين ١,٢-١,٩ .



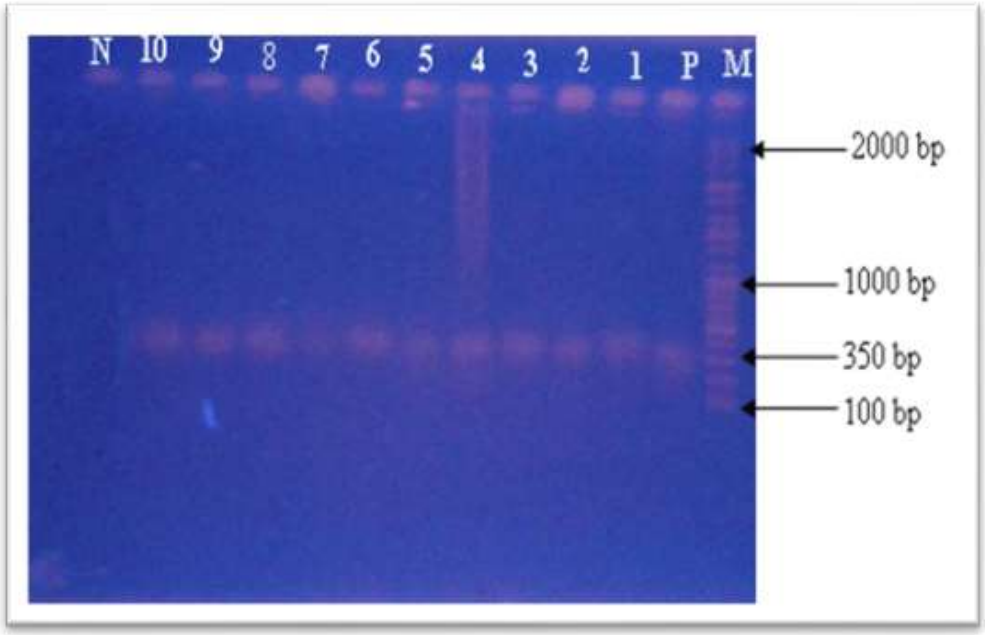
صورة (3) يبين حزم الـ DNA الذي تم استخلاصه من دم الأبقار وترحيله على هلام الاكاروزتركيز ٢%

استخدم البادئ الخاص بالكشف عن جنس*Babesia* بشكل عام (*Babesia* common) والمصمم بالاعتماد على (Figueroa *et al.*,1992). اذ أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام هذا البادئ إمكانية تشخيص جنس*Babesia spp* في عينات DNA المستخلصة والمستخدمة في هذا التفاعل وكما موضح في الجدول (٦) اذ ظهرت نتائج التضاعف على شكل حزم على هلام الاكاروز تركيز ٢% وبواقع ناتج تفاعل ٦٤٤ زوجا قاعديا (Base pair (bp)) وكما موضح في الصورة (٤) .



صورة (4) تبين ناتج تفاعل الـ PCR الخاص بجنس *Babesia* باستخدام البادئ الخاص بجنس *Babesia* بشكل عام إذ إن M تمثل الدليل الحجمي و p مجموعة السيطرة الموجبة وN مجموعة السيطرة السالبة والعينات (١-١٢) تمثل ناتج التفاعل بحجم ٦٤٤bpالتي رُحلت في هلام الاكاروز بتركيز ٢%.

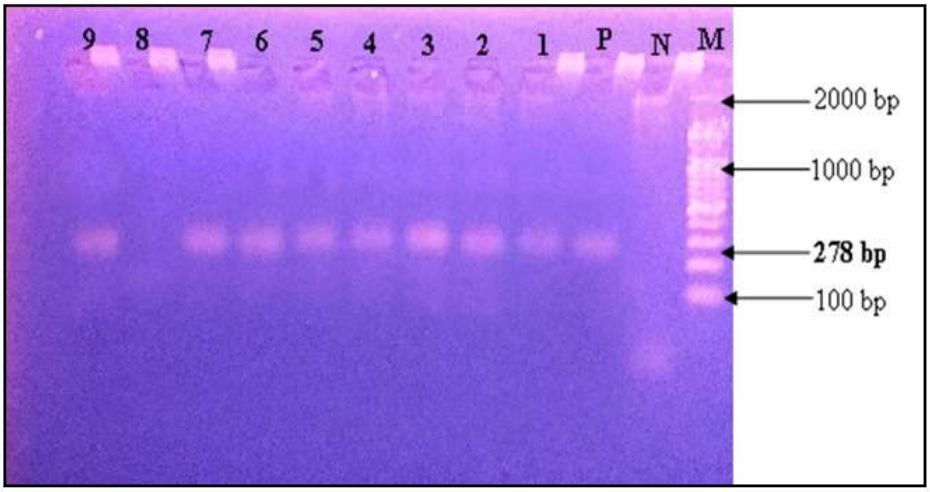
وأستخدم زوج البادئ الخاص بالكشف جينيا عن النوع *B.bovis* والخاص بالنوع *B.bovis* . اذ أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام هذا البادئ امكانية تشخيص النوع *B.bovis* في عينات DNA المستخلصة إذ ظهرت نتائج التضخيم على هلام الاكاروز تركيز ٢% على شكل حزم نتيجة وجود المواقع المكملة لها في جين النوع *B.bovis* وبواقع ناتج تفاعل ٣٥٠ bp وكما موضح في الصورة (5)



صورة (5) تبين ناتج تفاعل الـ PCR الخاص بالنوع *Babesia bovis* باستخدام البادئ الخاص*Babesia bovis* إذ إن M تمثل الدليل الحجمي وP مجموعة السيطرة الموجبة وN مجموعة السيطرة السالبة والعينات (١-٥ و٨-١٠ موجبة وعينة ٧ سالبة) تمثل ناتج التفاعل بحجم ٣٥٠bp التي رُحلت في هلام الاكاروز بتركيز ٢%

واستخدم زوج البادئ الخاص بالكشف جينيا على النوع *B. bigemina* والمصمم بالاعتماد على (Figueroa *et al.*, 1992).

اذ أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام هذا البادئ امكانية تشخيص النوع *B. bigemina* في عينات الـDNA إذ إن هذا البادئ أظهر نتائج تضاعف على هلام الاكاروز تركيز ٢% وعلى شكل حزم نتيجة وجود المواقع المكملة لها في جين النوع *B.bigemina* وبواقع ناتج تفاعل 278bp وكما موضح في الصورة (6).



صورة (6) تبين ناتج تفاعل الـ PCR الخاص بالنوع *Babesia bigemina* باستخدام البادئ الخاص *Babesia bigemina* إذ إن M تمثل الدليل الحجمي وP مجموعة السيطرة الموجبة وN مجموعة السيطرة السالبة والعينات (١-٧ و٩ موجبة الاصابة وعينة ٨ سالبة الإصابة) تمثل ناتج التفاعل بحجم ٢٧٨bp التي رُحلت في هلام الاكاروز بتركيز ٢%

DISCUSSION
المناقشة

اتفقت نتيجة هذه الدراسة مع دراسة (El-Fayomy *et al.*, 2013) و (Shams *et al.*, 2013) بان النتائج المتحصل عليها من الفحص المجهري تختلف قليلا عن التي حُصل عليها بـ PCR وهذا يعود إلى الحساسية العالية لهذه التقنية في التشخيص وهي ملائمة في تشخيص مدى واسع من الممرضات أوالعينات الصغيرة الحجم وذكر(Chaudhry *et al.*,2010) إن تقنية PCR أكثر حساسية وخصوصية لتحديد مستوى الإصابة الواطئة في الحيوانات الحاملة إذا ما قورنت مع الفحص المجهري إذ استخدم بادئات مشتقة من جين Small Subunit ribosomal RNA ولقد سجل إصابة بكل من *B.bovis* و*B.bigemina* ١١% و١٨% على التوالي وذلك من مجموع ١٠٠ عينة جمعت بشكل عشوائي من حيوانات تبدو سليمة سريريا أو حاملة للإصابة .

واتفقت نتيجة هذه الدراسة أيضا مع كل من (Hussian *et al.*, 2017) في باكستان و(Hossary, 2016) في مصر في تشخيص نسبة إصابة أعلى بطفيلي *B.bovis* بتقنية PCR من الفحص المجهري في سلالات الأبقار المحلية والهجينة وذلك باستخدام بادئات مصممة بالاعتماد على كل من (Zulfiqar *et al.*, 2012) و(Figueroa *et al.*,1993)، وأما في العراق فذكر(Sabber and Aaiz, 2016) في محافظة القادسية أن تحديد تكرار الإصابة بـ PCR, وnPCR يسمح بتشخيص *Babesia* خلال مراحل الإصابة الأولى وفي الحالات غير الظاهر عليها علامات المرض وهي تقنية مهمة جدا في الدراسات الوبائية ولاسيما وأن الحيوانات الحاملة للمرض تمثل مصدراً رئيساً لإصابة إناث قراد *Boophilus microplus* إذ سُجلت نسبة إصابة كلية بجنس *Babesia spp* والنوعين *B.bovis* و*B.bigemina* وذلك بطريقة تفاعل السلسلة المتبلمرة في الوقت الحقيقي بلغت ٤٣,٢٢%(١٩٢/٨٣) و٥٥,٤٢%(٨٣/٤٧) و٤٤,٥٧%(٨٣/٣٧) على التوالي.

يمثل صبغ المسحات الدموية الخفيفة او السميكة بصبغة الكيمزا الفحص الذهبي والقياسي في تشخيص *Babesia spp* في مختلف دول العالم (Garnham,1980) إذ يتم تشخيصها بقوة تكبير العدسة الزيتية X100 وهي قوة كافية لتمييز نوع *Babesia* الصغيرة الحجم المتمثلة بالنوع *B.bovis* (٢,٥-٠,٥ مايكرون) والكبيرة الحجم المتمثلة بالنوع *B.bigemina* (٣-٥ مايكرون) مع تحديد مواصفاتها الشكلية والقياسية وبيان موقعها داخل الكريات الحمر، ونظرا لكون هذه التقنية تحتاج إلى وقت غير محدد في الفحص المجهري والمهارة والدقة في الفحص والترشيح المستمر للصبغة للتأكد من خلوها من ترسبات الصبغة لغرض تقليل نسبة الخطأ (Thrall *et al.*,2004) فضلاً عن هذا فإن هذه التقنية تكون قليلة الحساسية low sensitivity ولاسيما في الحالات تحت السريرية Subclinical cases والحالات المزمنة Chronic phase والتي تمتاز بنسب تطفل واطئة جدا مما يجعلها مصدرا خطرا لاصابة القراد ومن ثم انتقال المرض للابقار (Wongsrichanalai *et al.*,1991) ولقد ذكر (DeVos and Potgieter, 1994) إن التمييز بين *B.bovis* و *B.bigemina* ليس سهلا ومن المستحيل تشخيص نوع الطفيلي من خلال معرفة التاريخ المرضي والعلامات السريرية والفحص العياني والفحص المجهري لمسحات الدم المصبوغة بالكيمزا فقط يستطيع التمييز بين الانواع ولكن اختلافات القياسات وأحيانا يجعل عملية التفريق تبدو صعبة ومتداخلة ، لذا ظهرت التقنيات البايولوجية الجزيئية في السنوات الاخيرة وفتحت آفاقا واسعة في تشخيص الإصابات الطفيلية إذ تسمح هذه التقنية بتضخيم أجزاء صغيرة من الـ DNA خارج جسم الكائن الحي وبذلك قدمت هذه التقنية إمكانيات كبيرة ودقيقة لتشخيص الممرضات ومنها الطفيليات فهي عبارة عن تقنية خارج خلوية تستعمل لنسخ أوتضخيم تتابع محدد من الـ DNA إذ تسمح بتضخيم قطعة الـ DNA صغيرة ملايين المرات (Al-Ibrahimi, 2008).

تعد عملية استخلاص وتنقية الحامض النووي الـ DNA من مصادره هي أول الخطوات الرئيسة في تقانات البايولوجية الجزيئية ومنها التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA (PCR) وهناك صعوبات وعوامل تواجه الباحث وتؤثر على تركيزالـ DNA المستخلص ونقاوته ومنها: حصول التلوث وفعالية الأنزيمات المحللة للاحماض النووية ودرجة الخبرة والتدريب في استخلاص الحامض النووي (Salah, 2014). واتفقت نتيجة استخلاص الـ DNA من دم الأبقار مع ماذكره (Al-Hassani, 2013) بان اتباع طريقة استخلاص الـDNA اليدوية المحورة قد أثبتت كفاءتها في الاستخلاص والحصول على تركيز وكمية مناسبة من الـ DNA لاستعمالها في تقنية التفاعل التضاعفي (PCR) لسلسلة الـ DNA إذ امتازت هذه الطريقة بقلة كلفتها فضلاً عن توفر المواد الكيمياوية والأجهزة المستعملة في عملية الاستخلاص فضلاً عن انها تستغرق وقتا قصيرا وانالـ DNAالمستخلص من الممكن حفظه لمدة طويلة بدرجة- ٢٠م°.

اتفقت نتيجة هذه الدراسة فيما يخص تشخيص *Babesia spp* بشكل عام باستخدام زوج البادئات المصمم بالاعتماد على (Figueroa *et al.*,1992) الذي أعطى ناتج تفاعل بواقع ٦٤٤ bp مع دراسة (Ibrahim *et al.*, 2009) الذي سجل نسبة إصابة بجنس *Babesia* بشكل عام وباستخدام زوج البادئات نفسه بلغت ٢٦% وإن تقنية PCR كانت معنويا

أعلى وأكثر كفاءة في تشخيص الكمثريات من الفحص المجهري. ذكر(Mahmmod, 2012) إنَّ زوج البادئ المستخدم لتشخيص جنس *Babesia* والمشتق من جين Small Subunit ribosomal RNA الذي استخدم في تضخيم وتحديد الـ DNA لجنس *Babesia* لايستطيع التفريق بين انواع *Babesia*، ايضا اتفقت نتيجة هذه الدراسة مع دراسة (El-Fayomy *et al.*, 2013) إذ سجل نسبة إصابة بجنس *Babesia spp* بتقنيةPCR والفحص المجهري بلغت ٢٣% و١٣% وذلك من مجموع ٥٢ عينة دم اختيرت من بين ١٢٣ عينة دم أبقار مريضة في بورسعيد في مصر واتفقت نتيجة هذه الدراسة مع دراسة (Chaudhry *et al.*, 2010) في تشخيصه نسبة إصابة كلية بجنس *Babesia* باستخدام PCR والفحص المجهري ٢٩% و١٨% على التوالي وذلك بالاعتماد البادئات المشتقة من جين Small Subunit ribosomal RNA وأشارت دراسة (Khamesipour *et al.*, 2015) في إيران بأن تقنية PCR حساسة جدا في تشخيص الـ DNA لطفيلي *Babesia* في عينات الدم للحيوانات التي جمعت بشكل عشوائي لكل من الماشية ٧,١% (n=١٠٠) والجمال ٦,٥٦% (n =١٢٢) في حين لم يشخص جنس *Babesia* في الأغنام (٠,٠٠%(n=٩٥) ولقد عُدَّت نتائج الفحص موجبة عند ظهور الحزم بواقع bp٤٢٨ لقطعة جين Small 18S RNA .

واتفقت نتيجة هذه الدراسة مع دراسة (Figueroa *et al.*,1992) بان زوج البادئ ذا الوزن الجزيئي ٢٧٨ bp يستطيع تحديد الكميات القليلة جدا من قطع DNA للطفيلي وإنه متخصص فقط للنوع *B.bigemina* وليس لتشخيص DNA لطفيلي *B.bovis* و*Anaplasma marginale* أو ستة انواع من البكتريا أو كريات الدم البيض وان ناتج PCR من الممكن تحديده في عينات الـ DNA المستخلص من ٢٠٠ مايكروليتر من الدم مع نسبة تطفل واطئة جدا (اقل من ١في 10^8) التي تحسب بـ٣٠ كرية دم حمراء مصابة بالطفيلي .

REFERENCES
المراجـع

*Al-Hassani, O.M.H. (2013) :*Determining the genetic variability of GALT gene in newborn. PhD. Thesis, University of Mosul, College of science, Mosul, Iraq, pp58 (In Arabic).

Al-Ibrahimi, A.K.K. (2008): Trichomoniasis studies in Basrah Province. Msc. Thesis, University of Basrah , College of Education Basrah, Iraq, pp67-68 (In Arabic).

Bhata, S.A.; Singha, N.K.; Singh, H.A.; Ratha, S.S. (2017): Molecular prevalence of *Babesia bigemina* in *Rhipicephalus microplus* ticks infesting cross-bred cattle of Punjab, India. Parasite Epidemiology and Control, 2: 85–90.

Bock, R.; Jackson, L.; Devos, A.; Jorgensen, W. (2004): Babesiosis of Cattle. Parasitology, 129: 247-269.

Caccio, S.; Camma, C.; Onuma, M. and Severini (2000): The b-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites in an informative marker for species discrimination. International Journal for Parasitology, 3: 1181-5.

Calder, J.A.M.; Reddy, G.R.; Chieves, L.; Courtney, C.H.; Littell, R.; Livengood, R.; Norval, R.A.I.; Smith, C. and Dame, J.B. (1996): Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-Based tests. Journal of Clinical Microbiology, 2748-2755.

Chaudhry, Z.I.; Suleman, M.; Younus, and Aslim, A. (2010): Molecular detection of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in Crossbred carrier cattle through PCR. Pakistan J Zool, 422: 201-204.

Demessie, Y. and Derso, S. (2015): Ticks borne hemoparasitic diseases of ruminants: A Review. Advances in Biological Research, 94: 210-224.

DeVos, AJ.; Potgieter, F.T. (1994): Bovine babesiosis in infections diseases of livestock Ed. Getzer JAW., Thomoson GR., Tustin RC..pp. 278-294. Capetown. Oxford University Press.

El- Fayomy, A.O.; Ghoneim, A.M.; Abu-Samak, O.A. and Khidr, A.A. (2013): Contribution of *Babesia* to the Illness of cows in Port Said Governorates, Egypt. Global Veterinaria, 111: 118-122.

Fahrimal, Y.; Goff, W.L. and Jasmer, P. (1992): Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. Journal of Clinical Microbiology, 306: 1374-1379.

Figueroa, J.V.; Chieves, L.P.; Johnson, GS. and Buening, GM. (1993): Muttiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina, Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood.. Vet. Parasitol, 50: 69-81.

Figueroa, J.V.; Chieves, L.P.; Johnson, G.S. and Bening, G.M. (1992): Detection of *Babesia bigemina* – infected carriers cattle by polymerase chain reaction amplification. J. Clin. Microbiol, 90: 2576-2582.

Garnham, P.C.C. (1980): Human babesiosis: European aspects. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. 74: 153-155.

Hamsho, A.; Tesfamarym, G.; Megersa, G. and Megersa, M.A. (2015): Cross – Sectional of Bovine babesiosis in Teltele district, Borena, zone, Southern Ethiopia. Veterinary science and Technology , 63 http://dx.doi.org/10.4172-2157-7579.1000230.

Hossary, A.A.T. (2016): Comparism between conventional and molecular methods for diagnosis of bovine babesiosis *Babesia bovis* infection in ticks infested cattle in upper Egypt .J Parasite Dis, 2016, DOI 10.1007 /s12639-016-0785-.

Hussain, S.; Ashraf, K.A.N.W.A.RN.; Jamal, M.A.; Naeem, H.; Ahmad, N. and Rahman, A.U. (2017): Diagnosis of *Babesia* infection in Iindigenous and crossbred cattle with comparison between conventional and molecular diagnostic techniques. Journal of Infection and Molecular Biology, 511-6.

Ibrahim, A.K.; El Behairy, A.M.; Mahran, K.A.; Awad, W.S. (2009): Clinical and Laboratory diagnosis of piroplasmide in naturally infected cattle in Egypt. J Egypt Vet Med Assoc, 692: 105-203.

Iranpur, V. and Esmailizadeh, A. (2010): Rapid extraction of high quality of animal science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, shahre kord, Iran www.protocol-online,org.

Khamesipour, F.; Doosti, A.; Koohi, A. and Chehelgerdi, M. (2015): Determination of the presence of *Babesia* DNA in blood samples of cattle ,camel and sheep in Iran by PCR. Arch Biol Sci Belgrade, 671: 83-90.

Mahmmod, Y.S. (2012): Molecular detection of natural *Babesia bovis* infection from clinically infected and apparently healthy water Buffaloes *Bubalus bubalis* and crossbred cattle. Journal of Buffalo Science, 1: 55-60.

Martins, T.M.; Neves, L.; Pedro, O.C.; Fafetine, J.M.; Dorsario, V.E. and Domingos, A. (2010): Molecular detection of *Babesia spp*. and other haemoparasitic infections of cattle in Maputo Prevince, Mozambique. Parasitology. P.1-8, Cambridge University Press., doi:10.1017/5003118200999/96x.

Oliveira, M.C.S.; Oliveira – Sequeira, T.C.G.; Amaraute, A.A.F.T. and Oliveira, H.N. (2005): Babesia spp infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in Sao Paulo State Brazil. Vet Parasitol, 130, 61-67.

Sabber, K.H. and Aaiz N.N. (2016): Molecular detection of *Babesia bovis* in cattle in AL-Qadisiyah Province . Iraqi Journal of Veterinary Science, 402: 155-158.

Salah, S.I.D. (2014): Measuring the genetic dimension of the local chicken and its comparison with birds strains chicken meat and eggs. Ph.D Thesis, University of Mosul, College of Agriculture and Forestry, Mosul, Iraq, pp 96-97 (in Arabic).

Sambrook, J.; Fritsh, E.F. and Manitis, T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual .2nd Ed., cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York.

Shams, S.; Ayaz, S.; Ali, I.; Khan, S.; Gul, I.; Gul, N. and Khan, S.N. (2013): Sensitivity and specificity of PCR and. Microscopy in detection of Babesiosis in domesticated cattle of Khyber Pakhunkhwa, Pakistan. International Journal of Advancements in Research and Technology, 2: 37-41.

Smeenk, I.; Kelly, P.J.; Wray, K.; Musuka, G.; Trees, A.J. and Jongejan, F. (2000): Babesia bovis and *Babesia bigemina* DNA deected in cattle and ticks from Zimbabweby polymerase chain reaction. JIS. Afr. Vet. Ass, 711: 21-24.

Terkawi, M.A.; Huyen, N.X.; Shinuo, C.; Impankaew, Maklon, K.; Aboulaila, M.; Uno, A.; Goo, Y.K.; Yakoyama, N.; JiHapalapong, S.; Xuan, X. and Igarashi, I. (2011): Molecular and Serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. Veterinary parasitology, 178: 201-207. 10.

Thrall, M.A.; Baker, D.C.; Campbell, T.W.; Dewicola, D.; Feltman, M.; Lassen, E.D.; Rebar, A. and Weisern, G. (2004): Veterinary hematology and clinical chemistry. Lippincott Williams wilking. A welters Kluwer company.: 9-20.

Viljoen, G.J.; Louis, H. and Grawther, R. (2005): Molecular Diagnostic PCR. Handbook. 1st ed. Springer. Dordrecht Netherlands, pp: 178-187.

Walker, A.; Bouattour, A.; Camicas, I.; Estrado Pena, A.; Horak, I.G.; Latif, A.A.; Pergram R.G. and Preston, P.M. (2003): Ticks of domestic animals in Africa. A guide to identification of species Bioscience Reports. Comiston Drive, Edinburgh EH105QR., Scotland U.K.,.

Wongsrichanalai, C.; Pornsilapapatip, J.; Namsiripongpun, V.; Webster, H.K.; Luccini, A.; Pansamdang, P.; Wilde, H.; Prasti, H. and Suk, M. (1991): Acridine orange fluorescent microscopy and the detection of malaria in population with low density parasitemia. American Journal of Tropical medicine and Hygiene, 44: 17-20.

*World organization for animal health (OIE)(2013):*Bovine babesiosis. OIE Technical disease cards. Scientific.dept@oie.int.

Zulfiqar, S.; Shahnawaz, S.; Ali, M.; Bhuta, AM.; Iqbal, S.; Hyat, S.; Qadir, S.; Latif, M.; Kiran, N.; Sad, A.; Ali, M. and Iqbal, F. (2012): Detection of *Babesia bovis* in blood samples and its effect on the hematological and serum biochemical profile in large ruminants from Southern Punjab. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 104-108.