متوفرة على الموقع:http://www.basra-sciencejournal.org

ISSN -1817 -2695

دراسة تقويمية لاستعمال الكازولين كمادة بديلة عن الأيثر في تقنية التركيز للكشف عن الطفيليات المعوية

أزهار فيصل جعفر* و فاتن عبد الجبار مصطفى

قسم علوم الحياة – كلية التربية– جامعة البصرة– البصرة– العراق

الاستلام 18–10–2011،القبول 14–12–2011

***Abstract* :الخلاصة**

قُيَمت كفاءة مادة الكازولين gasoline في تركيز مكيسات الآوالي وبيوض الديدان ولأول مرة في العراق كبديل عن مادة diethyl ether في تقنية فورمالين – أيثر في الكشف عن الطفيليات. تم جمع 90 عينة غائط وقسمت إلى أربع مجاميع: المجموعة الأولى لا تحتوي على اصابات طفيلية اما المجاميع الأخرى فقد احتوت على إصابات مفردة لطفيليات *Entamoeba histolytica* ، *Giardia lamblia*، *Hymenolepis nana* ركزت كل عينة باستعمال كلا المذيبين الايثر والكازولين بالإضافة إلى استعمال طريقة المسحة المباشرة. أظهرت نتائج الفحوصات أن 41 (45.5%) من العدد الكلي للعينات كانت حاوية على الطفيليات قيد الدراسة ، فضلاً عن عدم وجود فروق معنوية عند استعمال كلا المذيبين في عملية التركيز كما أظهرت الدراسة قدرة الكازولين في الحفاظ على الصفات المظهرية للمكيسات والبيوض مما يؤكد استعماله كمادة بديلة للايثر ذي المخاطر العديدة.

الكلمات المفتاحية: كازولين ، فورمالين – أيثر ، الطفيليات المعوية.

*Azhar.biol@yahoo.com

المقدمة : Introduction

تعد الإصابة بالطفيليات المعوية من المسببات الرئيسة للإسهال وتكون المسبب الثالث للوفيات في العالم إذ يبلغ عدد المتوفين 1.8 مليون شخص سنوياً [1] إذ تصيب جميع فئات المجتمع إلا أن الأطفال من أكثر فئات المجتمع تعرضاً للإصابة [2]، تشير الدراسات إلى أن طفيلي الأميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica* هي الأكثر شيوعاً في الإصابات الطفيلية المعوية يليه طفيلي *Giardia lamblia* [2] ثم طفيلي *Hymenolepis nana* [3].

تعدَ الأميبا الحالة للنسيج إحدى الأبتدائيات الطفيلية التي تسبب داء المتحولات الأميبي amoebiasis [4]. إذ يعد الإنسان المضيف الطبيعي للطفيلي وتحدث الأصابة نتيجة ابتلاعه الطور المتكيس cyst مع الطعام والماء الملوثين [5]، للطفيلي طوران رئيسان في دورة حياته هما الطور المتكيس cyst والطور المتغذي trophozoite ، يستطيع الطور المتكيس أن يبقى خارج الجسم لعدة أسابيع أو أشهر لاسيما في البيئة الرطبة [6]

إما الجياردیا لامبليا فهي كائنات وحيدة الخلية مجهريه حقيقية النواة مسوطة ، تعدَ من أشهر مسببات الإسهال في العالم [7] ،يعيش هذا الطفيلي في الأثني عشري وأحياناً في كيس الصفراء وتقدر نسبة الإصابة به 20–40% في الدول النامية[8] ، تنتقل مكيسات الطفيلي خلال المياه والطعام الملوث ، يسبب الطفيلي مرضgiardiasis الحاد.ولهذا الطفيلي طوران: الطور المتغذي والطور المتكيس [9].

تسبب الدودة الشريطية القزمة dwarf tape worm داء الهايمينوليبس Hymenolepiasis وتعد من الديدان الشريطية الواسعة الانتشار في العالم. توجد الديدان البالغة في الامعاء الدقيقة للإنسان والقوارض ولاسيما في فئران المنزل، وجد إن الأطفال معرضون للخمج بهذه الدودة أكثر من البالغين[10].

تستعمل عدة طرائق في تشخيص الطفيليات المعوية منها طريقة المسحة المباشرة direct smear التي تشمل استعمال محلول الملح الفسيولوجي normal saline التي تشخص حركة الابتدائيات المعوية من دون تغير شكلها ،أو استعمال محلول اللوكال أيودين ioden logal حيث تثبت الطفيليات وتستعمل لتصبيغ الأطوار المتكيسة للأبتدائيات وبيوض الطفيليات الأخرى [2] .

لطريقة المسحة المباشرة عدة مساوئ منها حصول فقدان لبعض الطفيليات خاصة إذا كان عددها قليلاً في العينة وبذلك قد تعطي نتيجة سالبة ولذلك يفضل أخذ ثلاث مكررات لكل عينة غائط بالإضافة إلى حصول تداخل بين الطفيليات و الفضلات الأخرى [11] إذ إنَ عينات الغائط فضلاً عن احتوائها على الطفيليات فهي تحتوي أيضا على مواد مخاطية ، بقايا ألياف نباتية وحيوانية ودهون وغيرها من المواد غير المهضومة وهذا مما يعيق الفحص ألمجهري لذلك تفضل تقنيات تركيز المكيسات وبيوض الطفيليات على طريقة المسحة المباشرة [12].

تعدَ طرق التركيز جزءاً مكملاً لفحص الطفيليات في المختبرات السريرية والبحث العلمي، وهناك نوعان من طرق التركيز :أولاً تقنية التطويف flotation technique.وثانياً تقنية الترسيب sedimentation technique اللتان تستخدمان لتميز مكيسات وبيوض الطفيليات عن الفضلات الموجودة في الغائط بسبب الاختلاف في الثقل النوعي specific gravity [13] .

تستعمل تقنية ترسيب فورمالين– أيثر بصورة شائعة في المختبرات لتركيز بيوض ومكيسات الطفيليات في عينات الغائط [14, 15]. ولهذه التقنية فوائد كثيرة منها أنها لا تؤدي إلى حدوث تغيرات في الصفات المظهرية للكائن الحي وتزيد من فرص الكشف عن بيوض الديدان ومكيسات الأبتدائيات [16] .

ومن مساوئ هذه الطريقة أن مادة ether هي المكون الرئيس والذي يعد مادة قابلة للاشتعال extremely flammable وتكون أبخرة مخدرة anesthetic vapor وتكون بيرو كسيدات متفجرة explosive peroxides عند تعرضها للضوء، فضلاً عن ذلك فأنها تنتج بيرو كسيدات قادرة على أحداث طفرات في سلالات بكتيريا *Salmonella typhimurium* [17] .

وبسبب تلك المخاطر فقد استعملت الكثير من المواد كبدائل عن مادة الأيثر في تقنيات تركيز الغائط مثل خلات الأثيل ethyl acetate [18] والمنظفات detergents [19] والأسيتون acetone [20] والتوين tween [12].وبسبب المخاطر آنفة الذكر فقد هدفت الدراسة الحالية إلى استعمال مادة جديدة آمنة ومتوفرة وبأسعار زهيدة وهي الكازولين في تركيز مكيسات طفيليات *E. histolytica, G. lamblia* وبيوض *H. nana* .

المواد وطرائق العمل:- Materials and methods

جمعت في هذه الدراسة 90 عينة غائط تم الحصول عليها من بعض المراكز الصحية في منطقة كرمة علي في محافظة البصرة ، جلبت العينات مباشرة إلى المختبر وفحصت أولاً بواسطة المجهر الضوئيmicroscope وباستعمال طريقة المسحة المباشرة لفصل العينات الموجبة أي الحاوية على الطفيليات المشمولة بالدراسة (*E. histolytica, G. lamblia, H. nana*) عن تلك التي لاتحتوي طفيليات . قسمت كل عينة إلى جزئيين ، ركز الجزء الأول باستعمال طريقة الأيثر- فورمالين والثاني باستعمال طريقة الأيثر كازولين وتم ملاحظة عدد العينات الموجبة في كلا التقنيتين (الأيثر والكازولين) والصفات المظهرية للطفيليات قيد الدراسة.

واتبعت الخطوات التالية للتقنيتين:

1-مزج 2 غم تقريباً من الغائط مع 20 مل من 10 % فورمالين باستعمال عود خشبي applicator stick

2- رشح 7 مل من المزيج أعلاه خلال طبقتين من الشاش في أنبوبة اختبار مخروطية 10 مل وأضيفت الكمية نفسها إلى أنبوبة أخرى .

3- أضيف 3 مل من الكازولين إلى أحدى الأنبوبتين و3 مل من الأيثر إلى الأنبوبة الأخرى ثم أغلقت كلا الأنبوبتين ورجت لمدة 30 ثانية .

4- وضعت الأنبوبتان في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 1500 دورة ولمدة دقيقتين.

5- تكونت أربع طبقات في كلا الأنبوبتين وهي المذيب (الأيثر أو الكازولين) وطبقة من الفضلات وطبقة فورمالين والراسب .

6- أزيلت طبقة الفضلات والفورمالين والمذيب وترك الراسب إذ مزج مع قطرتين من محلول الآيودين لوكال Lugol´s iodine .

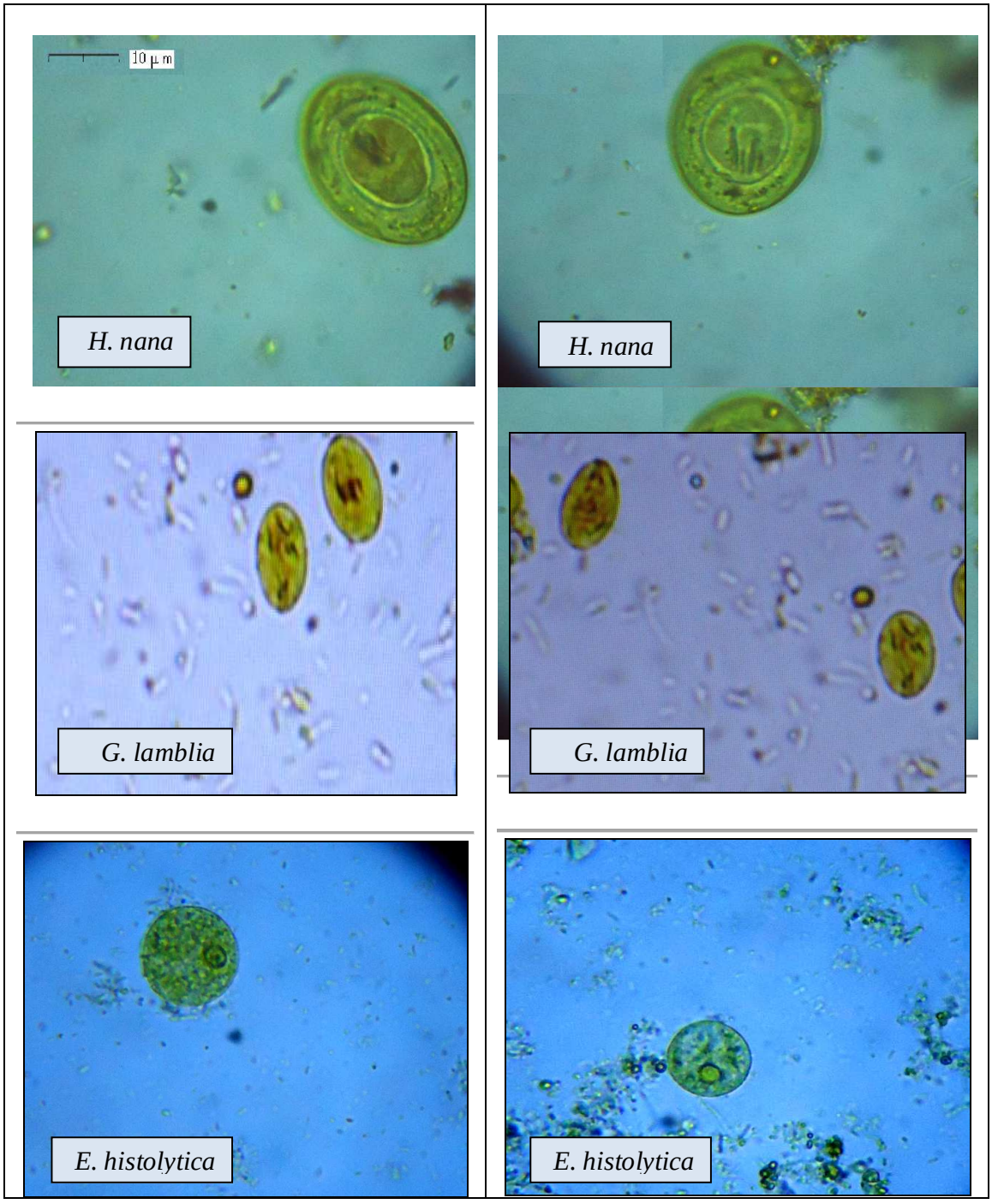
7- وضعت قطرة من الراسب على شريحة زجاجية slid ووضع عليها غطاء الشريحة وفحصت بالمجهر الضوئي تحت قوة 10 X ثم 40 X [22, 21] .

النتائج : Results

أظهرت نتائج فحص 90 عينة غائط بواسطة المجهر الضوئي أن 41 منها كانت حاوية على طفيليـات *E .h istolytica* أو *G. lamblia* أو *H. nana* . وبينت نتائج الفحص ألمجهري باستعمال التركيز بالفورمالين – أيثر والفورمالين – كازولين ان الصفات المظهرية لتلك الطفيليات كانت متشابه في كلا المذيبين كما هو موضح في الشكل (1)

أ- تقنية الفورمالين – أيثر

ب- تقنية الفورمالين – كازولين



شكل (1) صور للطفيليات المشمولة بالدراسة توضح الصفات المظهرية لها باستعمال أ:فورمالين – أيثر ب: فورمالين-كازولين

يبين الجدول (1) أن إعداد العينات الموجبة لطفيلي الزحار الأميبي كانت أكثر عند استعمال تقنية الفورمالين – كازولين مما هو عليه عند استعمال الأيثر ، إما مكيسات الجيارديا لامبليا وبيوض الدودة القزمة فكانت أعدادها أكثر

عند استعمال الأيثر، مع عدم وجود فروق معنوية عند استعمال كلا المذيبين عند مستوى احتمالية 0.05 .

جدول (1) يوضح أعداد الطفيليات المشمولة بالدراسة باستعمال تقنية فورمالين – أيثر، وفورمالين – كازولين.

نوع الطفيلي	عدد العينات الموجبة باستعمال المسحة المباشرة	عدد العينـات الموجبـة باستعمال فورمالين – كازولين	عدد العينات الموجبة باستعمال فورمالين – إيثر
E.histolytica(مكيسات)	10	25	20
G.lamblia (مكيسات)	3	8	11
H. nana (بيوض)	2	4	5
المجموع	15	37	36

المناقشة : *Discussion*

تزيد طرق تركيز غائط المصابين بالطفيليات المعوية ومنها تقنية التركيز بالفورمالين أيثر من فرص الكشف عنها حتى وأن كانت أعدادها قليلة في العينة، وتتطلب طرق التركيز تلك استخدام مادة الفورمالين لغرض تثبيت الطفيليات والمحافظة عليها، إما الايثر فيعمل على إزالة الدهون والزيوت ولكن له العديد من المخاطر على البيئة وعلى صحة الإنسان ولذلك عمد الباحثون لتقصي عن مواد أخرى لاستعمالها في تركيز مكيسات الاوالي وبيوض الديدان الطفيلية ومن بين هذه المواد مادة خلات الأثيل ethyl acetate .ومع أن هذه المادة فعالة في الكشف عن البيوض والمكيسات وتحافظ على الصفات المظهرية للطفيليات المركزة إلا إن لها الكثير من المساوئ [12] ومنها قد تكون بقع سميكة على السطح يصعب إزالتها وبالتالي فمن الممكن إن تمتزج مع الراسب، بالإضافة إلى ذلك فقد تتجمع فقاعات صغيرة ناتجة من خلات الأثيل المتبقية غير الذائبة تحت غطاء الشريحة حيث تؤدي هذه الفقاعات إلى صعوبة الكشف عن الطفيليات وعدم وضوحها [15] كذلك تعد مادة كيميائية خطرة حسب وكالة حماية البيئة Environmental protection Agencyومنظمات بيئية أخرى بالإضافة إلى أنها مادة سامة عند ملامستها الجلد والأغشية المخاطية [23, 22].

طورت فيما بعد تقنية الفورمالين – أيثر إلى تقنية فورمالين – مطهرات formalin- detergents [18] وعلى الرغم من أن هذه المادة تعد فعالة في الكشف عن الديدان المعوية إلا أنها غير جديرة بالاعتماد في الكشف عن مكيسات الأوالي وتتطلب ليلة كاملة لغرض الترسيب وكمية كافية من الغائط لترسيب الطفيليات .

وفي 2007 أستخدم الباحثان Ahmadi & pakdad مادة Tween التي تختلف عن الإيثر في أنها لاتتطاير ولا تنتج أبخرة مخدرة وآمنة وأقل كلفة ومع أن تقنية فورمالين – توين أثبتت فعاليتها وأفضليتها على تقنية فورمالين – أيثر في تركيز بيوض ومكيسات الطفيليات فضلاً عن محافظتها على الصفات المظهرية فأن الكمية التي تتطلبها هذه التقنية من الغائط تكون أكبر من تلك التي تتطلبها تقنية فورمالين – أيثر [24].

سجلت الدراسة الحالية كفاءة أكبر لمادة الكازولين في تركيز مكيسات *E. histolytica* مما هو عليه في تركيز مكيسات وبيوض الطفيليان الآخران، بينما أشار الباحثان Ahmidi & Damraj في 2009 في دراسة مقارنة لهما عند استعمال تقنيتي فورمالين – أيثر وفورمالين – كازولين

أن مادة الأيثر هي الأكفىء في تركيز مكيسات هذا الطفيلي من الطريقة الأخرى ، أن تباين نتائج الدراستين قد يعود إلى الاختلاف في عدد العينات المستعملة .

لكنها تتفق مع نتائج الدراسة السابقة في عدم حصول تغيرات في الصفات المظهرية للمكيسات الأوالي وبيوض الدودة القزمة وهذا مما يؤيد استعماله في الكشف عن تلك الطفيليات في المختبرات السريرية والبحث العلمي.

أن سهولة الحصول على مادة الكازولين من خلال محطات تعبئة الوقود ورخص ثمنه مقارنة بمادة الأيثر يجعله الأفضل في تركيز الغائط بواسطة تقنية الترسيب في المختبرات ذات الإمكانات المحدودة وكذلك في المراكز الصحية الموجودة في القرى والأرياف.

المصادر:- References

[1]-WHO. World Health Organization. (2004). Cited by Global Health Council (2005). Webmaster of Glob. Health Org. Internet in 2/3/2011.

[2]- الأسدي، حيدر عبد الجليل راضي الهزام. (2007). دراسة في وبائية بعض الطفيليات المعوية المرضية وإحيائية طفيلي الأميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica* في محافظة البصرة. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم جامعة البصرة.

[3] - مصطفى، فاتن عبد الجبار وعواد، عبد الحسين حبش. (2010).دراسة مدى انتشار كلاً من الدودة الشريطية القزمة *Hymenolepis nana* والدودة الدبوسية *Entrobius vermicularis* بين طلبة.المدارس الأبتدائية والمتوسطة والأهالي في محافظة البصرة.مجلة واسط للعلوم والطب، 3 (1):1-11.

[4]- Patri, Jr. W. A. and Singh, U. (1999). Diagnosis and management of amoebiasis. Clin. Infect. Dis., 29: 1117 – 1125.

[5]- Rivera, W. L.; Yason, J. A. and Adao, D. E. (2010). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in captive (macaca fascicularis) in the Philippines primates. 51:69 – 74.

[6]- Tanyuksel, M. and Petri, Jr. W. A. (2003). Laboratory diagnosis of amoebiasis. Clin. Microbiol. Rev., 16:(4): 713 – 729.

[7]- Barwick, R. S.; Levy, D. A. Braun, G. F. ; Beach, M. J. and Calderon, R. L. (2000). Surveillance for water-borne disease outbreaks- United States, 1997-1998. Morb. Mortal. Wkly. Rep. CDC serveill. Summ. 49(55-64): 1-36

[8]- Chacon – Cruz, E.; Mitchell, D. K.; Kumar, A. M. (2004). Intestinal protozoal diseases . Med. Lib. Internet 3/4/ 2011.

[9]- Gilllin, F. D.; Reiner, D. S. and McCaffery, J. M. (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. Annu. Rev. Microbiol., 50:679-705.

[10]- Markel, E. K.; Voge, M. and John, D. T. (1986). Medical parasitology, 6th W. B. Saunders Co.

[11]- Kuick, M. A. (2004). Amoebiasis . A. M. Fam. Phy. Sci., 70: 15 – 20.

[12]- Ahmadi, N. A. and Pakdad, K. (2007). Tween as a substitute for diethyl ether in the formalin – ether sedimentation technique

. Iranian J. publ. Health , 36: 91-95.

[13]- Garcia, L. S. and Ash, L. R. (1979). Diagnostic parasitology. The C. V. Mosby Company.

[14]- Ritchie, L. S.(1948). An ether sedimentation technique for routine stool examination Bull Us Army Med. Dept., 8:326.

[15]- Erdman, D. D. (1981). Clinical comparison ethyl acetate and diethyl ether in the formalin ether sedimentation technique. J. Clin. Microbiol., 14: 483 – 485.

[16]- Cheesbrough, M. (1998). District laboratory practicein tropical countries, Part 1. Cambridge University Press, Cambridge.

[17]- Boswell, M. V. and Collins, V. J. (1996). Diethyl ether and chloroform. In: Collins, V. J. Physiologic and pharmacologic bases of anesthesia. Williams & Wilkins, comparison of ethyl acetate and diethyl ether in the formalin ether sedimentation technique J. Clin. Microbiol., 14: 483 – 485.

[18]- Young, K. H.; Bullock, S. L.; Melvin, D. M. and Spruill, C. L.(1979). Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin – ether technique. J. Clin. Microbiol., 10: 852 – 857.

[19]-Kightlinger, L. and Kightlinger, M. B. (1990). Examination of feacal specimens by the formalin detergent technique. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 84: 417 – 418.

[20]- Parija, S. C.; Bhattacharya, S.; Padhon, P. and Shivaprakash, M. R. (2003). Evaluation of formalin acetone sedimentation in the concentration technique. J. Clin. Microbiol., 25: 425 – 426.

[21]- Beaver, P. C.; Jung, R. C. and Cupp, E. W. (1984). Examination of specimens for parasites. Clinical parasitology. 9th edn. Lea &Febiger, Philadelphia, pp 733 – 758.

[22]- Ahmadi, N. A. and Damraj, F. A. (2009). Afield evaluation of formalin – gasoline technique in the concentration of stool for detection of intestinal parasites. Parasitol. Res. , 104: 553 – 557.

[23]- Neimeister, R.; Logan, A. L.; Gerber, B.; Egleton, J. H. and Kleger, B. (1987). Hemo-De as substitute for ethyl acetate in formalin- ethyl acetate concentration technique. J. Clin. Microbiol., 25: 425 – 426.

[24]- Lewis, R. J. (1997). Hawleys condensed chemical dictionary, 13th ed. Van Nostrand Reinhold, New York.