

STUDY OF CRYPTOSPORIDIUM INFECTION AMONG CHILDREN ATTENDING THE PEDIATRIC HOSPITAL IN DAMASCUS

دراسة الخمج بخفيات الأبواغ عند الأطفال المراجعين لمشفى الأطفال في مدينة دمشق

Elen Ibrahim, MD; Morshed Kassouha; Abeer Al-kafri, MD

د. ايلين ابراهيم، د. مرشد كاسوحة، د. عبير الكفري

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to estimate the prevalence of cryptosporidium among children attending the Pediatric Hospital in Damascus.

Methods: 146 stool samples were collected from children attending the Pediatric Hospital in Damascus. Children were aged under 5 years. The study was conducted during the period from August 2013 to December 2014. Information about date of the sample collection, age, gender, symptoms, history of medications and previous hospitalization was taken. Samples were examined visually and microscopically by wet mount. Fecal smears were prepared and stained by modified Zeihl-Neelsen technique to detect the presence of cryptosporidium oocysts.

Results: Six samples out of 146 were positive which results in 4.1% infection rate among children attending the Pediatric Hospital in Damascus city.

Conclusions: Our study showed that the prevalence of cryptosporidium among children is 4.1% which is considerable compared to other parasites. We suggest routine stool examination for cryptosporidium by modified Zeihl-Neelsen technique or other available methods and the necessary of improving the sewage system, providing better water resources and the importance of health education to reduce the infection.

ملخص البحث

تم فحص العينات عياناً ومجهرياً بالفحص الندي مع إجراء لطاخة براز ملونة بطريقة تسيل- نلسون المعدلة لتحري وجود البيوض المتكيسة لخفيات الأبواغ.

النتائج: بلغ عدد العينات الإيجابية 6 عينات من أصل 146 عينة حيث بلغت نسبة الانتشار 4.1% عند الأطفال المقيمين والمراجعين لمشفى الأطفال بمدينة دمشق.

الاستنتاجات: لقد أظهرت دراستنا أن نسبة انتشار خفيات الأبواغ تبلغ 4.1% عند الأطفال وهي نسبة عالية مع العلم أنه لا يمكن تشخيص الخفيات بالفحص الندي مما يستوجب إدخال تحري خفيات الأبواغ ضمن

هدف البحث: دراسة الخمج بخفيات الأبواغ عند الأطفال المقيمين والمراجعين لمشفى الأطفال بمدينة دمشق ومعرفة نسبة الإصابة بها.

طرق البحث: تم جمع 146 عينة براز من الأطفال المقيمين والمراجعين لمشفى الأطفال الجامعي بمدينة دمشق دون الخمس سنوات من العمر وذلك في الفترة الواقعة بين شهر آب 2013 حتى شهر كانون الثاني 2014. تم تسجيل البيانات المتعلقة بتاريخ أخذ العينة، عمر المريض، جنسه والأعراض السريرية وقصة تناول أدوية أو استشفاء سابق ضمن استبيان خاص.

*Elen Ibrahim, MD; Damascus University, Damascus, Syria. E-mail: Dr.elen87@gmail.com

*Morshed Kassouha; Master degree in Veterinarian Medicine at Hama University, Syria.

*Abeer Al-kafri, MD; Assistant Professor in Damascus University, Arab International University (AIU), Damascus, Syria.

بالفحص الندي⁴ wet mount، لذلك غالباً ما يتم اللجوء إلى طرق التكثيف أو تلوين لطاخة براز .

يتم عادة تشخيص خفيات الأبواغ عن طريق الفحص المجهرى للطاخة براز ملونة باستخدام طريقة تسيل نلسون المعدلة (mZN) modified Zeihl-Neelsen إذ ما زالت تعتبر الطريقة الذهبية في المخابر الطبية خصوصاً في الدول النامية على الرغم من وجود طرق تشخيصية أخرى مثل الاستشراب المناعي أو المقايسة المناعية الانزيمية أو التآلق المناعي المباشر وغير المباشر وتضخيم الحمض النووي باستخدام تفاعل سلسلة البوليميراز polymerase chain reaction (PCR) وذلك بسبب كلفتها القليلة وحساسيتها الجيدة مقارنة مع غيرها من الطرق.⁵⁻¹

تحدث الإصابة عند الإنسان عن طريق تناول البيوض المتكيسة، ويختلف عدد البيوض المتكيسة المسببة للإصابة من مرجع لآخر، لكن معظم المراجع تشير إلى أن الحد الأدنى من البيوض المتكيسة هو 10 بيوض متكيسة لتسبب الإصابة عند الإنسان سوي المناعة، ومن الجدير ذكره أن الإنسان والحيوانات المصابة تطرح ما يقارب (710 - 1110) بيضة متكيسة في كل غرام من البراز.⁶

كشفت دراسة سريرية⁷ وبائية ضخمة في مطلع 2013 أجريت على 22500 طفلاً من أفريقيا وآسيا -بشكل غير متوقع- أن طفلي خفيات الأبواغ هو واحد من أربعة ممرضات مسؤولة عن التسبب في أكثر حالات الإسهال الحاد لدى الأطفال والرُّضع. كما أن الإسهال -وفق تقديرات منظمة الصحة العالمية WHO- مسؤول عن 10.5% من 8 ملايين حالة وفيات تقريباً لدى الأطفال تحت سن الخامسة كل عام.⁸

تختلف نسبة الانتشار عالمياً إضافة إلى اختلافها ضمن الدولة نفسها نظراً لاختلاف طرق التشخيص وحساسيتها وإدخالها ضمن الكشف الروتيني أم لا وتعتبر نسبة الإصابة عن طريق كشف البيوض المتكيسة بالبراز بشكل عام أقل من نسبة الإصابة المكتشفة بالطرق المصلية.^{1,5} إن نسبة الانتشار تتراوح وسطياً بين 2.1% في الدول المتطورة و8.5% في الدول النامية وتعتبر مسؤولة عن 30-50% من وفيات الأطفال تحت عمر الخمس سنوات في هذه الدول. لقد تم دراسة الانتشار عند الأطفال في الدول العربية مثل مصر، الأردن، العراق، ليبيا، فلسطين، تونس. وقد تراوحت النسبة بين 1-43% (وسطياً 8.7%) عند الأطفال أسوياء المناعة المصابين بالإسهال وتراوحت النسبة بين 1-82% (وسطياً 41%) عند مضعفي المناعة من الأطفال والبالغين مع ملاحظة زيادة إصابة سكان البادية عن سكان المدن⁹ ومن الجدير بالذكر أنه جرى تشخيص خفيات الأبواغ في سورية لأول مرة في عام 1991م.¹⁰

الفحص الروتيني للبراز وذلك باستخدام تلوين تسيل- نلسون المعدل أو غيرها من الطرق التشخيصية الأخرى المتوافرة مع أهمية تحسين الصرف الصحي ومصادر المياه وتطوير برامج التوعية الصحية للعائلة وذلك للحد من الإصابة.

مقدمة

خفيات الأبواغ هي بوائغ طفيلية تصيب الخلايا الظهارية المخاطية للعديد من الفقاريات بما فيها الإنسان مؤثرة على الاقتصاد والصحة العامة لملايين الأشخاص والحيوانات حول العالم.¹ أول من اكتشف خفيات الأبواغ هو تيزر Tyzzer عام 1912م واعتبرها ممرضة للإنسان عام 1976م. وفي الثمانينيات من القرن العشرين أصبحت تعد من العوامل المسببة لإنتان شديد مهدد للحياة عند المرضى مثبطي المناعة خاصة مرضى الإيدز. إن الخمج بخفيات الأبواغ محدد لذاته عند أسوياء المناعة خاصة الأطفال.

تشمل الإصابة بخفيات الأبواغ الأطفال والبالغين لكنها تعد المسبب الأساسي لحدوث الإسهال عند الأطفال تحت عمر الخمس سنوات في الدول النامية والمتقدمة. قد يكون المصابون لا عرضيين أو قد يحدث لديهم إسهال مزمن أو حاد اعتماداً على العمر وحالة الجهاز المناعي.²

يتظاهر الإنتان بخفيات الأبواغ في الأشخاص أسوياء المناعة بإسهال حاد محدد لذاته، أما عند المرضى مثبطي المناعة (تحت تأثير الأدوية أو الإيدز أو وجود انتان حالي كالحصبة أو الجدري) فتكون الأعراض السريرية لديهم أكثر شدة وقد تصبح مزمنة مؤدية إلى فقدان الشوارد ونقص الوزن وحتى الوفاة أيضاً.^{2,1}

كشفت أكثر من 20 نوعاً من خفيات الأبواغ حتى الآن وتعد خفيات الأبواغ البشرية *C. Hominis* وخفيات الأبواغ الصغيرة *C. Parvum* أكثر الأنواع إصابة للبشر خصوصاً في الدول النامية. يتوضع طفيلي خفيات الأبواغ داخل الخلية لكن خارج الغشاء الهيليولي للخلايا الظهارية البطانية للأمعاء العديد من الأسوياء وقد يوجد في مخاطيات خارج الأمعاء مثل الطرق التنفسية أو المرارة خصوصاً عند المرضى مثبطي المناعة.¹

إن الشكل المعدي لخفيات الأبواغ هو البيوض المتكيسة *Oocyst* التي يتم طرحها مع البراز و تقيس بين (4-6 ميكرون) ذات شكل دائري أو بيضوي وجدار سميك يقاس 49 نانومتر يتكون من ثلاث طبقات *trilaminar* وتحوي في داخلها على أربع بوائغ *sporozoites* متحركة كما تحوي على أجسام متبقية *residual bodies* تلعب دوراً في تأمين التغذية والطاقة للأبواغ.³ لا يمكن بسهولة تمييز البيوض المتكيسة بالبراز

طرق البحث

النتائج

تم جمع 146 عينة برازية للأطفال بين عمر الـ 40 يوماً وخمس سنوات وتوزعت العينات بين الذكور والإناث إذ شملت الدراسة 89 ذكراً (60.9%) و57 أنثى (39.1%). توزعت العينات بين 109 عينات إسهالية مع 37 عينة غير إسهالية وقد وجد لدينا بالتلوين المقاوم للحمض 6 عينات تحوي البيوض المتكيسة لخفيات الأبوغ أي بنسبة 4.1% (الجدول 1)، توزعت العينات الإيجابية بين الذكور والإناث إذ وجد لدينا 4 عينات عند الذكور مقابل 2 عند الإناث وتوزعت العينات حسب العمر وفق (الجدول 2)، إذ بلغ متوسط عمر الإصابة 30 شهراً مع نسبة إصابة 5.4% لعمر سنتين وأقل و 4.1% لعمر بين السنتين و4 سنوات. شوهدت 5 عينات إيجابية خفيات الأبوغ ضمن العينات الإسهالية بنسبة 4.6% مقابل عينة واحدة شوهدت ضمن الحالات غير الإسهالية (2.7%).

شوهدت طفيليات أخرى أيضاً ضمن الفحص الندي للعينات البرازية توزعت حسب الجدول 3 إذ كانت نسبة العينات الإيجابية التي تحوي طفيليات بغض النظر عن خفيات الأبوغ 2.7% ويشغل طفيلي الجيارديا النسبة الأكبر 5.4%، إضافة إلى وجود مشاركة لهذه الطفيليات مع خفيات الأبوغ كما يوضح الجدول 4، ولم تشاهد بيوض لأي ديدان أبداً. بلغ عدد العينات الإيجابية في فصل الصيف عينتين فقط بينما شوهدت 4 في فصل الشتاء.

عدد العينات السلبية	عدد العينات الإيجابية	عدد العينات الكلي
140	6	146
%95.9	%4.1	%100

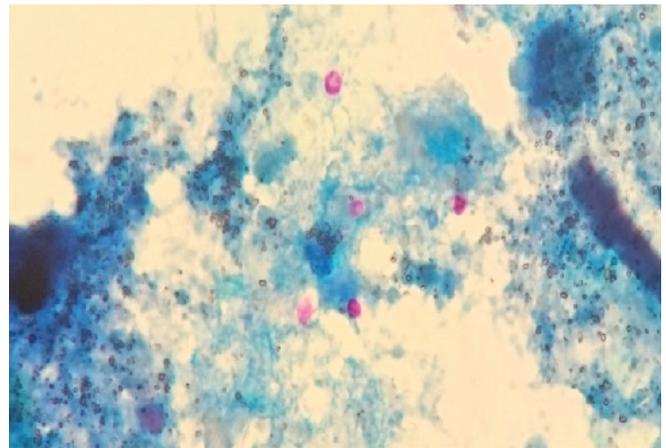
الجدول 1. عدد العينات الكلي وتوزعها بين الإيجابي والسلبي.

الفئة العمرية	40 يوم - 2 سنة	2 - 4 سنوات	4 - 5 سنوات
عدد العينات	74	63	9
عدد العينات الإيجابية	4	2	0

الجدول 2. توزع العينات بالنسبة للفئات العمرية.

تم جمع 146 عينة براز من الأطفال المقيمين والمراجعين لمستشفى الأطفال الجامعي في مدينة دمشق والذين تتراوح أعمارهم بين 40 يوماً وأقل من خمس سنوات وذلك في الفترة الواقعة ما بين شهر آب 2013 حتى شهر كانون الثاني 2014. وتم تسجيل البيانات المتعلقة بتاريخ أخذ العينة وعمر المريض وجنسه والأعراض السريرية وقصة تناول أدوية أو استشفاء سابق. تم استبعاد الأطفال الذين يتناولون المطهرات المعوية ومضادات الإسهال والرحضات الشرجية إلى جانب أطفال شعبة الحواضن. أجري فحص كل العينات عيانياً لتحديد اللون والقوام ومجهرياً باستخدام الفحص الندي باليود والمصل الفيزيولوجي لتحري وجود طفيليات أو بيوض ثم تم تحضير لطاخة براز وتلوينها باستخدام تلوين تسيل- نلسون المعدل (mZN)¹¹ وذلك بعد أخذ جزء من العينة واستحلابها بالمصل الفيزيولوجي على الشريحة الزجاجية ثم انتظار جفافها وبعدها تثبت بالفورمول لمدة 5 دقائق وبعد ذلك تغمر الشريحة بالفوكسين الكثيف لمدة 4 دقائق ثم تغسل ونضيف بعدها مزيل اللون الحامضي (حمض الكلور بتركيز 1%) لمدة دقيقة مع الغسل ثم يضاف زرقة الميتيلين أو أخضر الملائشيت كملون تباين لمدة 3 دقائق ثم تغسل وتجفف. تفحص الشريحة باستخدام العدسة الجافة (X40) ثم العدسة الغاطسة (X100). تظهر البيوض المتكيسة لخفيات الأبوغ بشكل دائري إلى بيضوي قليلاً تقيس بين 4-6 ميكرون ذات لون زهري مائل إلى الأحمر مع حدود واضحة وتلون غير متجانس مع وجود حبيبات داكنة اللون داخلها وقد يشاهد حولها هالة بيضاء بسبب حدوث الانكماش، الشكل 1.

تم تحديد العينات السلبية والإيجابية وفق التلوين باستخدام طريقة تسيل نلسون المعدلة، وتم تأكيد العينات الإيجابية بفحصها بالـ PCR.



الشكل 1. البيوض المتكيسة بعد التلوين باستخدام mZN (الباحثة).

الذي يستدعي التفكير بوجود تلوث في مصادر المياه والتي تعتبر عاملاً هاماً في انتشار هذين الطفيليان معاً، كما أن زيادة نسبة الإيجابيات في فصل الشتاء مقارنة مع فصل الصيف يوجه إلى هذا الاحتمال أيضاً حيث أن خفيات الأبواغ لا تتحمل التجفاف ودرجات الحرارة العالية المشاهدة بالصيف.

عند مقارنة دراستنا مع دراسات أخرى وجد أن نسبتنا أقل بكثير من النسبة المشاهدة في الدراسة التي أجريت في دمشق¹² عام 1999م من قبل اسماعيل والتي كانت نسبة الانتشار فيها 24.09% وقد يعود هذا التراجع في نسبة انتشارها إلى زيادة الوعي الصحي وتحسن الظروف المعيشية للسكان مع تحسن الصرف الصحي في مدينة دمشق وريفها منذ تلك الفترة خصوصاً بعد إنشاء محطة عدرا للصرف الصحي سنة 2000-2001، كما لم يشاهد أي فرق في الإصابة بين الجنسين مع ذروة للإصابة بعمر تحت الخمس سنوات بنسبة 71.7% خصوصاً بعمر 10-15 شهراً، وشهدت المشاركة مع الجiardia كما في دراستنا بسبب مقاومة طفيلي الجiardia لكافة طرق معالجة المياه الخاصة بالصرف الصحي وكانت النسبة 13.2% وقد يرجع ذلك لكبير حجم العينة.

وكانت النسبة في دراستنا أقل أيضاً من النسبة المشاهدة في مصر إذ بلغت 15.3%¹³ مع نسبة إصابة أعلى بعمر 1-2 سنة دون وجود فرق بين الجنسين، إن الاختلاف بالظروف البيئية والمنطقة المدروسة ودرجة الوعي الصحي واختلاف مصادر المياه والتي تعد من أهم مصادر الانتشار إضافة إلى اختلاف الفاحص وخبرته المجهرية قد يكون هو السبب لاختلاف هذه النسبة.

وفي دراسات مشابهة كالتالي أجريت في مدينة أصفهان في إيران بلغت النسبة 4.6، 14%¹⁴ ومعظم الإصابات كانت تحت عمر الخمس سنوات (89.2%) (وسطياً عمر 38 شهراً) مع عدم وجود فرق بالإصابة بين الجنسين. وفي كينيا بلغت النسبة أيضاً 4%¹⁵ دون وجود فرق بالإصابة بين الجنسين مع وسطي عمر الإصابة 36 شهراً وهي نسب قريبة للنسبة التي حصلنا عليها في دراستنا.

الاستنتاجات

لقد أظهرت دراستنا أن نسبة انتشار خفيات الأبواغ تبلغ 4.1% عند الأطفال وهي نسبة عالية بين الطفيليات المعوية الأخرى مما يستوجب إدخال تحري خفيات الأبواغ ضمن الفحص الروتيني للبراز وذلك باستخدام تلوين تسيل- نلسون المعدل أو غيرها من الطرق التشخيصية الأخرى المتوافرة مع أهمية تحسين الصرف الصحي ومصادر المياه وتطوير برامج التوعية الصحية للعائلة وذلك للحد من انتشارها.

عدد العينات الكلي	المتحول الكولوني	المتحول الزحاري	جيارديا	خفيات الأبواغ	خفيات الأبواغ + جيارديا
146	4	2	8	6	2
100%	2.7%	1.3%	5.4%	4.1%	1.3%

الجدول 3. توزع الطفيليات المشاهدة بالنسبة للعدد الكلي للعينات.

عدد العينات ايجابية الطفيليات	خفيات الأبواغ	طفيليات أخرى
20	6	14
100%	30%	70%

الجدول 4. توزع خفيات الأبواغ والطفيليات الأخرى في العينات ايجابية الطفيليات ونسبها.

المناقشة

تُعد خفيات الأبواغ أحد الطفيليات المسببة للإسهال عند البشر وتشخيصها يعتمد على طريقة خاصة بتلوين عينة البراز ولأن كشفها لا يتم بفحص البراز الندي روتينياً فإن الدراسات حولها قليلة جداً في بلدنا لذا كان هدف دراستنا هو معرفة نسبة انتشار خفيات الأبواغ عند الأطفال تحت عمر الخمس سنوات المقيمين والمراجعين لمشفى الأطفال الجامعي في دمشق.

لقد أظهرت دراستنا نسبة انتشار بلغت 4.1% ضمن 146 عينة برازية مع زيادة نسبة الإصابة في العينات الاسهالية 4.6% مقارنة بالعينات غير الاسهالية 2.7% مما يوجه إلى ارتباط خفيات الأبواغ بحدوث نسبة هامة من الاسهالات عند الأطفال ولم يشاهد أي اختلاف بين نسبة الإصابة بين الذكور والإناث ($p < 0.5$). كانت نسبة الإصابة الأكبر تحت عمر السنتين قد يعود ذلك أن هذه السن هي بداية سن المشي مع الأطفال والاحتكاك مع البيئة والأطفال الآخرين مما يزيد فرص العدوى. لقد بلغت الإصابات الطفيلية ضمن العينات نسبة 2.7% ولم تشاهد أي بيوض لأي ديدان أبداً مما يدل على تحسن الظروف الصحية والمعيشية وزيادة الثقافة الصحية إلى جانب تحسين الصرف الصحي ومصادر المياه الأمر الذي أدى إلى تراجع نسبة الإصابة الطفيلية. لقد شوهدت نسبة المشاركة الأكبر بين طفيلي خفيات الأبواغ مع الجiardia 1.3% مقارنة مع باقي الطفيليات وقد شكلت الجiardia النسبة الأكبر من الإصابات الطفيلية 5.4% الأمر

REFERENCES

1. Sears LC, Kirkpatrick DB. editors. *Principle and practical of clinical parasitology*. 1st ed. New York: John Wiley & sons; 2001. p. 140-55.
2. Warrell D, Cox MT, Filth J. editors. *Oxford textbook of medicine: Infection*. 5th ed. United Kingdom: Oxford university press; 2012. p.722-32.
3. Xiao L, Fayer R. editors. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 2nd ed. USA: CRC press; 2007. p. 21-27.
4. Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. *Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis*. *J Clin Pathol* 1985; 38(12):1337-41.
5. Vohra P, Sharma M, Chaudhary U. *A comprehensive review of diagnostic techniques for detection of cryptosporidium parvum in stool samples*. *IOSR J Pharmacy* 2012;2(5):15-26.
6. Satoskar RA, Simon LG, Hotez JP. editors. *Medical parasitology*, 1st ed. Landes Bioscience: USA; 2009. p. 214-21.
7. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, et al. *Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study*. *Lancet* 2013;382(9888):209-22.
8. Liu LI, Johnson HL, Cousens S, et al. *Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000*. *Lancet* 2012;379(9832):2151-61.
9. Ghenghesh SK, El-Mohammady H, Franka E. *Cryptosporidium in countries of the Arab world: the past decade (2002-2011)*. *Libyan J Med* 2012;7.
10. Ismail MT. *La cryptosporidiosis en Syria*. *Nouvelles Scientifiques* 1995; p. 72-6.
11. Goldman E, Green HL. *Practical handbook of microbiology*, 2nd ed. New York; CRC press: 2009. p. 41-2.
12. Ismail MT, Al kassar BD. *Cryptosporidium in children*. Damascus university 1999.
13. El-helaly N, Aly MM, Attia SS. *Detection of cryptosporidium infection among children with diarrheea*. *New York Science J* 2012;5(7):68-76.
14. Saneian H, Yaghini O, Yaghini A, et al. *Infection rate of cryptosporidium parvum among diarrheic children in Isfahan*. *Iran J Pediatr* 2010;20(3):343-7.
15. Gatei W, Wamae C, Mbae C, et al. *Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis and symptoms associated with infections in children in Kenya*. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75(1):78-82.