دراسة تشخيصية لطفيلي*Giardialamblia* المرافق لتلوث مياه الشرب في بعض الاحياء السكنية في مدينةالديوانية باستخدام طريقة التطويف وتقنية تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي.

تاريخ الاستلام : 2015/3/5 تاريخ القبول :2015/4/26

خديجة عبيس حمود الخالدي/جامعة القادسية/ كلية العلوم
Khadeeja.abees@qu.edu.**iq**

الخلاصة :-

تضمنت الدراسة الحالية فحص 140 عينة ماء ماء شرب جمعت من سبعة احياء سكنية في مركز محافظة القادسية شملت حي الصدر الثالثة ،حي الانصار، حي النهضة، حي الجزائر، حي الحكيم، حي التقية ، حي العروبة، وضعت العينات في حاويات معقمة ونقلت الى المختبر واتبعت طريقة التطويف لغرض فحص العينات وتشخيص طفيلي الـ *Giardialamblia*، اذ اشارت النتائج الى ان نسبة تلوث مياه الشرب بالطفيلي في الاحياء المذكورة بلغت22.85 %بواقع 32عينة ملوثة ولوحظ بأن اعلى نسبة تلوث سجلت في مياه شرب حي الصدر الثالث حيث بلغت 45% واقلها في مياه كل من حي الحكيم وحي التقية اذ بلغت 5% لكل حي ودلت نتائج التحليل الاحصائي على وجود فروق معنوية في نسب تلوث مياه الشرب بين الاحياء المشمولة بالدراسة تحت مستوى احتمالية. $P\leq 0.05$. كما اشارت نتائج الكشف التأكيدي عن الجين التشخيصيGiardin ذو الوزن الجزيئي 218bpالخاص بطفيلي الـ*G.lamblia*باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي الى ان نسبة تلوث مياه الشرب بطفيلي *G. lamblia*بلغت 5.71% بواقع 8 عينات.

الكلمات المفتاحية: طفيلي الجياردیا،تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي، تلوث مياه الشرب.

MicrobiologyClassification QR – 74.5

المقدمة -:

تنتشر في بيئة الانسان انواع كثيرة من الاحياء التي قد تكون مفيدة او ضارة ومنها الطفيليات، الفايروسات، البكتريا، الفطريات، وبعض هذه الاحياء مفيدة وهامة لحياه الانسان بشكل مباشر وغير مباشر وخاصة الانواع التي تستقر وتتكاثر بصورة طبيعية وبأعداد كبيرة في الامعاء ولكن على الجانب الاخر هناك انواع من هذه الاحياء تكون ممرضة ومعدية تؤدي الى الامراض والوفيات اذا وصلت الى الجهاز الهضمي للإنسان وحتى لبعض الحيوانات الأليفة التي يتغذى عليها الانسان (1)، اذ تنتشر الامراض الناتجة من الاصابة بالطفيليات بصورة كبيرة جداً في العالم خاصة في بلدان العالم النامية التي تعاني من الفقر وتدني مستوى الخدمات الصحية الاساسية وعدم توفر مياه شرب نقية وبكميات كافية، وتظهر معظم الاعراض المرضية الناتجة عن التلوث لدى الاطفال الصغار ،اذ تظهر عليهم مضاعفات مرضية مثل الاسهال المائي او الدموي، ضعف النشاط العام، نقص الوزن ، فقر الدم(2).

يعتبر الماء من الوسائل المناسبة والسهلة لنقل الاحياء الممرضة المختلفة للإنسان ومنها الطفيليات مثل *Isospora belli, Giardia lamblia, Cryptosporidium. Entamoebahistolytica* (3).

ولأهمية الماء في الحياة العامة فقد حضي باهتمام الكثير من الباحثين من خلال قيامهم بعدة دراسات لتسليط الضوء على اهم المسببات المرضية التي تنتقل الى الانسان عن طريقه ومن تلك الدراسات مايلي:

ذكر الباحث (4)ان كل من طفيلي *Giardialamblia* , *Cryptosporidium* يعدان من المسببات المرضية الرئيسية للإمراض المعوية الناتجة من تلوث المياه في العالم.

كما تمكن الباحث (5) من فحص54عينةمن المياه السطحية الطبيعية واشار الى وجود 4 عينات احتوت على طفيلي *Cryptosporidium* وعينة واحدة احتوت على طفيلي *Giardia lamblia*.

اما الباحث (6) فقد قام بدراسه لتشخيص المسببات المرضية في مياه شرب المستشفيات توصل من خلالها الى وجود كل من طفيلي *Acanthamoeba* بنسبة 17% ،*Naegleria* بنسبة 35%، *Volcamfia* بنسبة 27%، *Hartmatela* بنسبة 9% وهدبيات اخرى بنسبة 2.1% .

كما ذكر (7) في دراسته التي تضمنت فحص 275 عينة مياه البحر ،بأن نسبة تلوث تلك العينات بالطفيليات كانت 81% مسجلا عدة انواع منها *Giardia lamblia,Cryptosporidium, Entamoeba coli*.

في دراسة مسحية اجراها الباحث (8) للتحري عن الطفيليات الملوثة لمياه الشرب المفلتره توصل الى ان هناك 17% (0.29-69 cysts/ 100L) من العينات كانت ملوثة بالطفيليات المعوية شملت طفيلي *G. lamblia, Hymenolepis nana, Blastocystishominis ,E. coli, E.histolytica*.

نظراً لقلة الدراسات المتعلقة بالكشف عن مسببات تلوث مياه الشرب في محافظة القادسية ، جاءت هذه الدراسة

لتشخيص طفيلي *G.lamblia*في مياه شرب بعض الاحياء السكنية في مدينة الديوانية لكون هذا الطفيلي اكثر الاوالي الحيوانية انتشاراً وإمراضيه للإنسان لكون الكيسCysts هو الطور البيئي الاكثر مقاومة اذ تصل مدة بقاءه في البيئة والمياه السطحية الى عدة شهور ومن ثم تنتقل الى الانسان بطريقة مباشرة او غير مباشرة(9).

Repeat cycle	Time	Temperature	PCR step

المواد وطرائق العمل

1- **جمع العينات Samples collection**جمعت عينات مياه الشرب من بعض الاحياء السكنية في مدينة الديوانية شملت حي الصدر الثالثة، حي الانصار، حي النهضة، حي الجزائر، حي الحكيم ، حي التقية ، حي العروبة وكانت عملية الجمع تتم بواقع مرتين لكل شهر واستمرت من الفترة 2014/3/1 ولغاية 2014/12/1، وضعت العينات في حاويات معقمة ثم سجل عليها تاريخ الجمع واسم المنطقة ونقلت الى مختبرات كلية العلوم/ جامعة القادسية لغرض الفحص المجهريوالجزيئي.

2- الكشف عن الطفيليات

بحثاً عن اكياس طفيلي *G. lamblia*في عينات مياه الشرب استخدمت طريقة التطويف وحسب ماذكرت في (10)وتقنية تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي Conventional -PCRواجريت حسب ما ذكر في(11) ويعتمد هذا الاختبار على ثلاث مراحل:

3-تحديد نتائج التضاعف على هلام الأكاروز.

1- **بادئات التشخيص Primers**

استخدمت البادئات الخاصة بجين (Giardin) ذو الوزن الجزيئي 218bp المسؤول عن تشخيص طفيلي *G. lamblia* في عينات مياه الشرب باستخدام تقنية الـ -Conventional

1- استخلاصExtraction الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA من العينات.

2-تضاعفAmplification الحامض النووي منقوص الاوكسجين باستخدام البادئات Primersالخاصة بطفيلي *G. lamblia*.

PCR وحسب تسلسلها النيكلوتيدي الذي ورد في(14,13,12) وقد تم تجهيز البادئات من قبل شركة Bioneerالكورية.الجدول(1).

الجدول (1): يمثل البادئات التي استخدمت في هذه الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي .

1-*Giardia lamblia*

Primer		Sequence	References
Giardin gene	F	5¯CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA¯3	(14,13,12)
	R	5¯TTTGTGAGCGCTTCTGTCGTGGCAGCGCTAA¯3	

AccuPower® 2X GreenStarTM PCR Master Mixوكذلك من

4- **حالات الدورات الحرارية PCR Thermocycler conditions**تم تطبيق الدورات الحرارية لفحص الـ PCR وذلك بالاعتماد على تعليمات عدة خلال حساب درجة الـ Tm البادئات وذلك باستخدام جهاز الـMiniOpticon PCR system BioRad. USA كما في الشكل ادنى:

5- طريقة اختبار تفاعل سلسلة البلمرة الاعتياديconventional PCR

حُضر مزيج التفاعل باستخدام عدة الـAccuPower PCR Premixالمجهزة منقبل شركة الـ BIONEER الكورية وحسب تعليمات الشركة:

Initial Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	10 sec	45
Annealing\Extention Detection(scan)	58 °C	30 sec	

الجدول(2): مكونات خليط تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي Conventional PCR.

PCR Master mix		Master Mix Volume (µl)
DNA template		5 µl
Primers	F.Primer	µl 1.5
	R.Primer	µl 1.5
	PCR water	12µl
Total		20µl

6-التحليل الاحصائي Statistical analysis

تم تحليل البيانات باستعمال البرنامج الاحصائي SPSS (version 10.5 software) حيث استخدم اختبار مربعكاي X^2-Square لتحديد الفروقات المعنوية تحت مستوى احتمالية $P\leq 0.05$ وحسب ماذكره(15) .

النتائج والمناقشة

اشارت نتائج الدراسة الحالية باستخدام طريقة التطويف لفحص 140 عينة ماء جمعت من بعض الاحياء السكنية في مدينة الديوانية، الى ان نسبة تلوث تلك المياه بطفيلي *G. lamblia* كانت 22.85%كما موضح في جدول رقم (3) وهي اقل من النسب77.7%،26.8%،46%, المسجلة في دراسة كل من (3,6,16) على التوالي وقد يرجع سبب الاختلاف في نسب التلوث المذكورة على اساس اختلاف عدد العينات المفحوصة وطرائق الفحص المستخدمة في التشخيص ومناطق الدراسة والخدمات الصحية المتوفرة والمتباينة بين المناطق وربما تكون نسب التلوث المسجلة في هذه الدراسة اقل من النسب الحقيقية لكون الدراسة وكما ذكرنا سابقاً شملت بعض الاحياء في منطقة الدراسة.

يعود سبب تلوث مياه الشرب بطفيلي*G. lamblia* الى ان اكياس هذا الطفيلي لا تتأثر بتركيز مادة الكلور التي تضاف لتعقيم مياه الشرب من الميكروبات الضارة وهذا ما أكده (3).

كما تبين من النتائج الى ان اعلى نسبة تلوث والبالغة 45% قد سجلت في عينات مياه شرب حي الصدر الثالثة تلتها مياه شرب حي الانصار، حي النهضة، حي الجزائر وبنسب 35%،25%،30% على التتالي واقل نسبة كانت 5% سجلت في عينات مياه كل من حي الحكيم وحي التقية واشارت نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروق معنوية في نسب تلوث مياه الشرب بين الاحياء السكنية تحت مستوى احتمالية $P\leq 0.05$وكما مبين في الجدول رقم (3).

X^2المحسوبة=6.127 X^2 الجدولية= 3.625

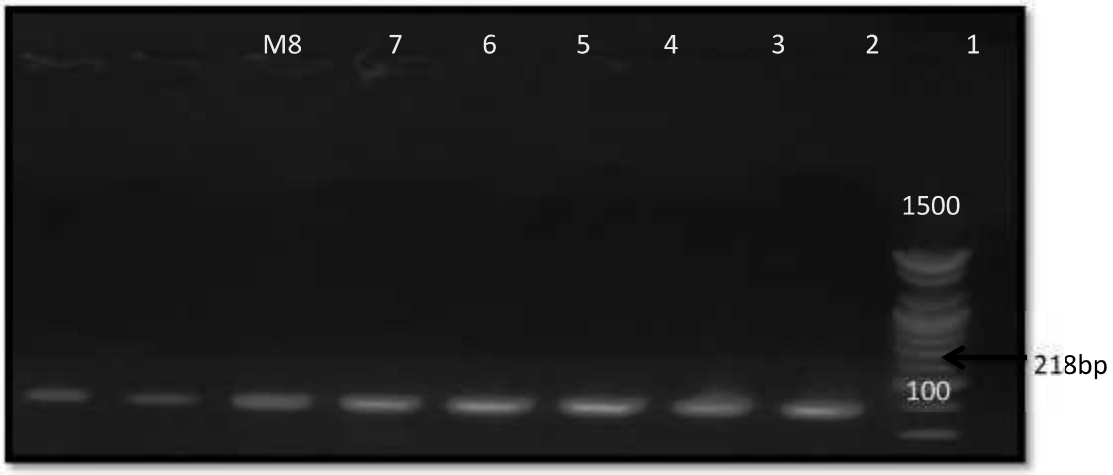
قد يعزى سبب ارتفاع نسب تلوث مياه الشرب في حي الصدر الثالثة وحي الانصار وحي النهضة وحي الجزائر بأكياس طفيلي*G.lamblia*الى كون مجاري تصريف المياه الثقيلة في اغلب الاحياء تكون ممتدة بمحاذاة مجاري مياه الشرب وهي على الاغلب قديمة ومتأكلة مما يؤدي الى تسرب المياه وامتزاجها مع بعضها وبالتالي تلوث مياه الشرب بالملوثات المختلفة.

ولغرض تأكيد تشخيص طفيلي *G. lamblia* في مياه الشرب استخدمت تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي Conventional-PCRللتحري عن الجين Giardin ذو الوزن الجزيئي 218bp في140 عينة من مياه الشرب، اذ لوحظ هناك 8 عينات اعطت نتيجة موجبة وبنسبة5.71% وكما موضح في الصورة رقم (1)، من خلال النسب المسجلة في الدراسة الحاليةيمكن القول بأن التشخيص باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي هو الافضل والاكثر دقةفي الكشف عن طفيلي*G.lamblia* ، اذ تمتاز الطرق الجزيئية بحساسيتها وخصوصيتها العاليتين فضلاً عن قدرتها على التمييز بين انواع الجنس الواحد (17)في حين تعتمد طرق التشخيص التقليدية (طريقة التطويف مثلاً) على الخبرة الشخصية في القدرة على تمييز اكياس الاوالي وبيوض الديدان (18) وربما قد تكون العينات المفحوصة في الدراسة الحالية حاوية على الانواع الاخرى لجنس الـ*Giardia* لذلك كانت نسبة التلوث

الجدول رقم (3): يبين نسب تلوث مياه الشرب في الاحياء السكنية المشمولة في الدراسة بطريقة التطويف

الاحياء السكنية	العدد الكلي للعينات المفحوصة	عدد العينات الملوثة	% للتلوث
حي الصدر الثالثة	20	9	%45
حي الانصار	20	7	%35
حي النهضة	20	5	%25
حي العروبة	20	3	%15
حي الجزائر	20	6	%30
حي الحكيم	20	1	%5
حي التقية	20	1	%5
المجموع	140	32	%22.85

باستخدام طريقة التطويف اعلى من نسبة التلوث باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي.



الصورة (1):الأعمدة 1-8 تمثل عينات مياه الشرب الملوثة والموجبة تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي ، حيث يظهرالجينGairdin ذو الوزن الجزيئي 218bp الخاص بطفيلي*G.lamblia* في ثماني عينات ،العمود M يمثلLadder ذو الوزن الجزيئي bp 100-1500 .

المصادر :-

1- Tarane, R., Jafar, M. (2002). Intestinalparasitic contamination in urban and rural area of Feridoonkenar city in Mazandaran , Tehran public health school .J.m1(1):39-48.

2- Hassan, A., Farouk, H., and Abdul-Ghani,R.(2012).Parasitologicalcontaminationof freshly eaten vegetables collected from local markets in Alexandria,Egypt: A preliminary study. Food Control, 26:500-503.

3-Yousefi , Z. Ziaei, H. A. Enayati, IR. A. Mohammadpoor.(2009). Parasitic contamination of wells drinking water in Mazandana province. Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.,6(4):241-246.4-Rebecca A. Guy; Pierre P.; Ulrich J.Krull and Paul A. H.(2003).Real-time PCR for Quantific--ation of *Giardia* and *Cryptos-poridium*in Environmental water samples and Sewage. American society forMicrobial.9(69):5178-5185.

10- باكر، ج.(1973).الاوالي الطفيلية .ترجمة الالوسي، توفيق ابراهيم .كلية الطب البيطري.جامعةالموصل.الصفحة: 86-

8911-Jiang, J., Alderisio, K. A., Sinagh, A., and Xiao, L. (2004). Development ofProcedures for Direct Extraction of *Cryptosporidium*DNAfromWaterConcentr ates and for Relief of PCR Inhibitors.Applied and Environmental. Microbiology 71(3): 41135 –1141.

12-Ionas, G., Farrant, K.J., McLena- chan, P.A., Clarke, J.K., and Brown, T. J.(1997). Species Differentiation of Giardia by PCR. International Journal ofEnvironmental Health Research, 7: 63 – 69.

13-Rochelle, P. A., Leon, R. D.,Stewart, M. H and Wolef, R. (1997). Comparisonof Primers and ptimization of PCR Conditions for Detection of *C. parvum*and*G.lamblia* in Water. Applied and Environmental Microbiology. 63:106–114.

14-Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Perlin,M. H. Schaefer III, F. W., Jakubowski,W., and Atlas, R. M. (1992).Differentiation of *Giardia duodenalis*fromother*Giardia spp*. by using polymerase chain reaction and gene probes. J.Clin. Microbiol. 30:74–78.

5-Rimhanen-Fiune R, Horman A, Ron-kainen P, Hanninen ML. (2002).AnIC-PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface water in Finland. J Microbiol.50(3):299-303.

6-Hosseini doust, S. R.(1997).Water parasitic contamination in Tehran hospitals ,2nd National Congress of Iran parasitic diseases,Tehran, 19-22.

7- Tamburrini ,A. Pozio, E. (1999).Long-term survival of *cryptocporidiumparvum*Oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilusgalloprovincialis*).Int .J. Parasitol. 29:711-5.

8- Paul, R. Hunter, .,(2001).Waterborne disease epidemiology and ecology 2nd Wiley and Sons:1-93.

9-Dawson, D. (2005). Foodborne protozoan parasites. International Journal ofFoodMicrobiology ,103: 207- 227.

15-Niazi, A. D.(2001).Statistical analysis in medical research. Nahrein University, Republic of Iraq.

16-Lechevallier, M. W., Norton, W.D.; Lee,R.G.(1991).*Giardia* and*Cryptos-poridium spp.* Infiltered drinking water supplies. Appl. Environ. Microbiol. 57:2617-26215.

17- Verweij, J. J., Blange, R. A., Temp-leton, K., Schinkel, J., Brienen, E. A., vanRooyen, M. A., van Lieshout, L., Polderman, A. M. (2004). Simultaneousdetection of *Entamoebahistolytica, Giardia lamblia* , and *Cryptosporidiumparvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. J ClinMicrobiol. 42, 1220-1223.

18-Lebbad, M. (2010). Molecular Diagnosis and Characterization of twointestinal Protozoa: *E.histolytica*&*Giardiaintestinalis* . Swedish institute forInfectious diseases control, thesis .Ph.D. Microbiology .Tumor and cell Biology.Karolinskainstitutet Stockholm Sweden.57 P

Identification study of *Giardialamblia*which associated with drinking water in some areas in AL-Diwaniacity by using flotation method and Conventional-

Receved :5/3/2015 Accepted : 26/4/2015

KhadeejaAbeesHmood.
AL-Khalidi /AL-Qadisia university/Sciences college.
Khadeeja.abees@qu.edu.iq

Abstract

The present study which including testing 140 samples of drinking water which taken from seven area in AL-Diwanyiaregion by using the flotation
method and conventional-PCR for identified and diagnosed of *G.lamblia*
,the results of this study refers into the
percentage of drinking water contamination was %22.85.Also, the results were showing, the higher percentage of contamination was recorded in drinking water in the AL-Sadder area was %45 and the lowerpercentage was in AL-Tagia and AL-Hokum area which was %5 of each one of them.
The results of statistical analysis ,showing there were significant differentiation in the percentage of drinking water between areas in probabilitylevel 0.05.Also the results of confirmative detection of Giardin gene by using conventional-PCR, showing the percentage of contamination drinking water was %5.71.

Keyword: *Giardia lamblia*,Conventional-PCR, Drinking water contamination