الكشف عن طفيلي المقوسة الكوندية *Toxoplasma gondii* في تربة الحدائق المنزلية لبعض الأحياء السكنية في مدينة الديوانية.

أ.د.هادي مدلول الميالي[1] أ.د.خيري عبد الله داود[2] م.د.خديجة عبيس حمود[3]

1-جامعة القادسية/كلية التربية 2-جامعة القادسية/كلية الطب 3-جامعة القادسية /كلية العلوم

الخلاصة

تضمنت الدراسة الكشف عن أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية Toxoplasma gondii في 100 عينة (500 غرام للعينة الواحدة) من تربة الحدائق المنزلية (تربة رملية وطينية) لعشرة أحياء سكنية في محافظة الديوانية ضمت حي الصدر الأول، حي النهضة، حي الفرات، حي الوحدة العربية، حي الإسكان القديم، حي الحكيم، حي العروبة، حي الجزائر، حي المتقاعدين، حي الجامعة خلال الفترة من شهر تموز 2011 ولغاية شهر آب 2013 باستخدام طريقة الترسيب والتطويف كتشخيص أولي كما تم استخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة للتحري عن الجينB1 في عينات التربة ، أشارت نتائج الدراسة إلى أن النسبة المئوية لوجود أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية كانت 10% (5 عينات) باستخدام طريقة التطويف و4 % (2 عينة) باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي.

الكلمات المفتاحية: تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي، *Toxoplasma gondii*، تلوث التربة، التطويف، الترسيب

Khadeeja.abees@ qu.edu.iq

*البحث مستل من أطروحة دكتوراه

المقدمـــة Introduction

إن داءالمقوسات Toxoplasmosis واحد من الأمراض المشتركة بيــــن الإنسان والحيـوان Zoonotic Diseases والذي يسببه طفيلي يعود إلى مجموعة الأكريات Coccidia، صنف البوغيات Sporozoa يعرف بطفيلي المقوسة الكوندية *Toxoplasma gondii* وهو طفيلي داخل خلوي إجباري Intracellular obligate parasite وخاصة في الخلايا ذات الأنوية كما لوحظ وجوده داخل النواة [1]يصيب هذا الطفيلي مختلف الأنسجة لجميع أنواع اللبائن من ضمنها الإنسان والقطط[3,2]، إذ تشكل عائلة السنوريات Felidae المضيف النهائي للطفيلي وأحياناً وسطي بينما تمثل اللبائن والطيور مضائف وسطية له[4] كما سجلت الإصابة بداء المقوسات أيضا في اللبائن البحرية كالحيتان والدلافين وأسد البحر وكلاب البحر[5].

يمتاز هذا الطفيلي بوجود ثلاثة أطوار معدية وهي طور كيس البيض Oocyst الذي يطرح إلى البيئة الخارجية مع براز القطط المصابة التي تتكون بداخله الأبواغ المصيبة لاحقاً وطور الحوينات سريعة التكاثر Tachyzoite التي تنقسم بسرعة داخل جميع خلايا المضيف النهائي والوسطي وأحياناً تحاط كائنات هذا الطور بكيس غير منتظم الشكل رقيق الجدار يعرف بالكيس الكاذب Pseudocyst، وطور الحوينات البطيئة التكاثر Bradyzoite التي تتكاثر ببطيء داخل كيس ذو جدار سميك يعرف بالكيس النسيجي Tissue cyst الذي يتكون داخل الأعضاء المختلفة من جسم المضيف ويختلف هذا الكيس في الحجم والشكل تبعاً للعمر وموقع الإصابة إذ أنه يكون ذو شكل متطاول في العضلات ودائري أو بيضوي الشكل في بقية الأعضاء [6].

تصاب القطط بطفيلي المقوسة الكوندية نتيجة لتناولها أنسجة المضائف الوسطية المصابة بالطفيلي والحاوية على الأكياس النسجية مثل القوارض والطيور أو بواسطة أكياس البيض المطروحة من قبل قطط مصابة أخرى والمتبوغة في البيئة [7]، إذ تطرح القطط المصابة لأول مرة بطفيلي المقوسة الكوندية مايقارب100 مليون كيس بيض في برازها قبل أن تتولد الأجسام المضادة في مصولها [8] لذلك يفضل فحص براز القطط عند تشخيص طفيلي المقوسة الكوندية أكثر من الكشف عن الأجسام المضادة [9].

ينتقل المرض إلى الإنسان بالدرجة الأساس عن طريق تناول اللحوم غير المطبوخة جيداً والحاوية على أكياس النسيج الحيه والغذاء والماء الملوثين بأكياس البيض، بالإضافة إلى عمليات نقل الدم التي تعد مهمة في نقل المرض في طوره الحاد وكذلك عمليات نقل الأعضاء والتي قد تكون مصابة إلى الأشخاص الأصحاء الذين يتم إعطائهم أدوية مثبطة للمناعة والتي تلعب دوراً مهماً في حدوث المرض [10] ولاتزال هنالك طرق مهمة اخرى في نقل المرض مثل استنشاق الغبار الملوث بأكياس البيض أو تناول الحليب الطازج غير المبستر والحاوي على الأطوار المعدية للطفيلي [11] فضلا عن طريقة الانتقال من الأم إلى جنينها عبر المشيمة[6,12].

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1 - طرائق العمل

أ - جمع عينات التربة Collection of soil samples

تم جمع 100 عينة (500 غرام للعينة الواحدة) من تربة الحدائق المنزلية (تربة رملية وطينية) لعشرة أحياء سكنية في محافظة الديوانية التي شملت حي النهضة، حي الوحدة العربية، حي الصدر الأولى، حي الإسكان القديم، حي العروبة، حي الجزائر، حي الفرات، حي الحكيم، حي المتقاعدين، حي الجامعة، وبعمق 10 سم، جلبت العينات إلى مختبر الطفيليات في كلية التربية/ جامعة القادسية بعد تسجيل رقم العينة ومكان وتأريخ الجمع.

ب - فحص العينات Samples examination

فحصت العينات بطريقتين:

1- طريقة الترسيب Sedimentation method

اتبعت الطريقة المذكورة[13] المحورة التي تضمنت أخذ 250 غرام من كل عينة ووضعت في بيكر زجاجي سعة 1000 مل وعلقت العينات بـ750 مل من الماء المقطر لكل عينة ثم رشح العالق بواسطة عدة طبقات من الشاش لإزالة المواد الخشنة منه بعد ذلك جمع الراشح ووزع على أنابيب اختبار سعة 5 مل ثم طردت الأنابيب بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق، جمع الراسب في دورق زجاجي سعة 1000 مل وعلق في 100 مل من المحلول السكري (1.150sp.gr) ثم وزع العالق على أنابيب اختبار وطردت مرة أخرى بسرعة 1000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق، ثم أخذ

25 مل من الطافي الكلي وخفف بالماء خمسة مرات ثم وزع مرة أخرى على أنابيب الاختبار وطردت بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق، أخذ الراسب وفحص بوضع قطرة من الراسب على شريحة زجاجية ووضع فوقها غطاء الشريحة، ثم فحصت تحت المجهر للتحري عن أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية باستخدام قوة التكبير 40X.

2- طريقة التطويف وتفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي
Flotation Method and Polymerase Chain Reaction

اتبعت طريقة [14] التي تضمنت أخذ 250 غرام المتبقية من كل عينه، جففت العينات بدرجة حرارة الغرفة لمدة يومين ثم نخلت التربة بواسطة مناخل ذات فتحات بلغت 4.75mm ، بعد ذلك تم أخذ 40 غرام من التربة المجففة، لغرض تركيز أكياس بيض الطفيلي في العينات استخدمت طريقة التطويف باستخدام محلول نترات الصوديوم المشبع (NaNo3) ذي الكثافة 1.282g/cm3، وضعت عينة التربة في دورق زجاجي سعة 2000 مل ثم أضيف إليها 100 مل من محلول NaOH بتركيز5% وخلط المزيج بواسطة الهزازShaker لمدة 20 دقيقة ثم وزعت العينات على أنابيب اختبار بلاستيكية سعة 5 مل، طردت الأنابيب بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة/ دقيقة لمدة 3 دقائق بعد ذلك أزيل الطافي وأخذت الحبيبات المترسبةPellets وغسلت بالماء المقطر ثم طردت مرة أخرى بالسرعة والمدة الزمنية المذكورتين سابقا، علقت الحبيبات المترسبة في محلول نترات الصوديوم المشبع ومزج الخليط جيداً ثم طردت الأنابيب مرة أخرى وبنفس السرعة والمدة الزمنية المذكورتين أعلاه ثم أضيفت كمية أخرى من محلول نترات الصوديوم المشبع حتى وصل إلى فوهة الأنبوبة، غطيت فوهات الأنابيب بواسطة غطاء الشريحة Coverslid لمدة 15 دقيقة بعدها أخذت أغطية الشرائح وغسلت بالماء المقطر وجمع ماء الغسيل بأنابيب Eppendorff سعة 1.5 مل (وقبل غسل أغطية الشرائح ،أخذت كمية قليلة بحجم رأس عود الثقاب من عالق غطاء الشريحة بواسطة عيدان خشبية Sticks ووضعت على شريحة زجاجية ثم وضع غطاء الشريحة عليها وفحصت تحت المجهر للكشف عن أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية بطريقة التطويف باستخدام قوة التكبير(10X)، في حين حفظت أنابيب Eppendorff بدرجة حرارة 20- م لحين استخلاص الدناDNA Extraction منها .

3- طرائق التشخيص **Diagnosis Methods**

أ- اختبار تفاعل سلسلة البلمرة **Polymerase Chain Reaction(PCR)**

تم إجراء هذا الاختبار باستخدام العدد الخاصة به والمجهزة من قبل شركة BIONEER ويعتمد هذا الاختبار على ثلاث مراحل:

1- استخلاصExtraction الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA من عينات التربة.

2- تضاعفAmplification الحامض النووي منقوص الاوكسجين باستخدام البادئات Primers الخاصة بطفيلي المقوسة الكوندية *T.gondii*

3- تحديد نتائج التضاعف على هلام الأكاروز.

1-الاستخلاص من عينات التربة **Extraction from soil samples**

تم استخلاص الحامض النووي حسب الطريقة المذكورة في [15] وكمايلي:

1- استخرجت أنابيب Eppendroff المجمدة وتركت لحين إذابتها ثم طردت الأنابيب بسرعة 14000-16000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق.

2- أضيف 100 مايكروليتر من محلول TE buffer الحاوي على 1.5% من SDS و1% من PVP إلى الأنابيب للتخلص من المثبطات الموجودة في عينات التربة.

3- تركت الأنابيب مستقرة لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

4- أضيف 200 مايكروليتر من محلول Phenol-Chloroform إلى الأنابيب ثم طردت بسرعة 14000-16000دورة/ دقيقة لمدة 30 ثانية.

5- أضيف 200 مايكروليتر من كحول Isopropyl إلى الأنابيب ثم طردت الأنابيب بسرعة 14000-16000 دورة / الدقيقة لمدة 30 ثانية ثم سكب الطافي Supernatant وتركت الحبيبات المترسبة Pellets

6- أضيف كحول الإيثانول (80%) إلى الأنابيب ثم طردت بسرعة 14000-16000دورة/ دقيقة لمدة 30 ثانية.

7- سكب الطافي وتركت الأنابيب الحاوية على الـ Pellets في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.

8- أضيف 8 مايكروليتر من الماء الخالي من أنزيم النيوكليز Ionized distal water إلى الأنابيب بعد ذلك حفظت الأنابيب بدرجة 20- م لحين الاستخدام.

وبعد أن تم الاستخلاص من جميع العينات تم تفاعل السلسلة البلمرة باستخدام بادئات متخصصة Specific primers حيث استخدم زوج من البادئات Pairs of primers الخاصة بالجين التشخيصيB1 (399bp) الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية بالنسبة لتفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي Conventional- PCR ،هذه البادئات تم تصميمها باستخدام (NCB1 Gene-Bank Primer3 , No.AF179871.1) وجهزت من قبل شركة (BIONEER Company, Korea) وكما موضح تتابعاها النيوكلوتيدية في الجدول (2) ويتكون خليط التفاعل وكما مبين في الجدول (2) من مايلي:

1- إنزيم البلمرة Taq polymerase.
2- خليط من القواعد النتروجينية الاربع dNTPs mixture.
3- محلول الـ PCR المنظم (10X).
4- كلوريد المغنيسيوم$MgCl_2$.
5- ماء خالي من إنزيم النيوكليز H_2O free nuclease.
6- DNA template.

(المكونات من1-5 تكون موجودة بشكل جاهز في أنبوبة الـ PCR Mix Tube المجهز مع العدة).

الجدول(1): التتابع النيوكلوتيدي المفرد للقواعد النتروجينية للبادئات Primers وحجم ناتج تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي Conventional PCR

البادئات Primers	تتابع القواعد النتروجينيةSequence	حجم الناتج product(bp)size
Forward primer	5 -GAACCACCAAAAATCGGAGA-3	399bp
Reverse primer	5 -GATCCTTTTGCACGGTTGTT-3	

2 - طريقة اختبار تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي Test Producer of conventional PCR

حُضر مزيج التفاعل باستخدام عدة الـ Accu Power-PCR Premix المجهزة من قبل شركة الـ BIONEER الكورية وحسب تعليمات الشركة وكالاتي:

1- استخدمت أنابيب الاختبار الخاصة باختبار تفاعل سلسلة البلمرة التي تدعى PCR Mix Tubes (والمجهزة مع عدة الاختبار) والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة وضيفت المكونات الأخرى لمزيج التفاعل وكما في الجدول (2):

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

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

2- بعد أكمال تحضير مزيج التفاعل تم غلق الأنابيب ومزجت بعناية بجهاز المازج Vortex لمدة خمس ثوان.

3- نقلت جميع أنابيب اختبار الـ PCR الحاوية على مزيج التفاعل ووضعت في جهاز الـ Thermal cycler وتم إجراء التفاعل وبحسب خطوات البرنامج التالية والمبينة مع عدة الاختبار وكما موضح في الجدول (3):

دورة واحدة بدرجة حرارة 95 م لمدة 5 دقائق لغرض المسخ الابتدائي Initial denaturation .

ثم 42 دورة بدرجة حرارة 95 م لمدة خمسة عشرة ثانية و65 م لمدة خمس وعشرون ثانية ثم 72 م لمدة خمس وعشرون ثانية أيضا وأخيرا 72 دورة لمدة دقيقة واحدة لإعطاء الناتج النهائي .

3- تعد العينة موجبة عند ظهور الحزمة (399bp) المتخصصة بالجين B1 الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية T.gondii بالنسبة لتفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي.

الجدول(3): برنامج تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي Conventional PCR لتضخيم الجين B1 الخاص بطفيلي المقوسة *T.gondii*.

Steps	Temperature(C°)	Time	Cycle
Initial denaturation	95	5 min.	1
Denaturation	95	15 sec.	42
Annealing	65	25 sec.	
Extension	72	25 sec.	
Final extension	72	1 min.	1

3- تحضير هلام الأكاروز Preparation of Agarose- gel

حضر هلام الأكاروز بحسب الطريقة الموصوفة من قبل [16] وذلك بإذابة 1.5 غرام من مسحوق الأكاروز في 100 مل من محلول الترحيل TBE على صفيحة حرارية Hot plate عند درجة حرارة 100م ثم أضيفت اليه صبغة الاثيديوم برومايد المشعة (0.3 مايكروليتر/100مل) بعد أن برد الهلام إلى درجة حرارة 50 م.

4- تحضير صفيحة الإسناد Preparation of Tray

بعد أن برد هلام الأكاروز إلى درجة حرارة 50 م، صب الهلام في صفيحة الإسناد بعد أن تم تثبيت مشط التثقيب(Comb) على بعد1 سم من الحافة الأمامية للصفيحة ترك الهلام ليتصلب لمدة 20 دقيقة بعدها رفع المشط بحذر تاركاً الحفر Wells في الهلام التي سوف يتم فيه تحميل عينات الـ DNA المستخلص .

5- تحميل عينات DNA Loading of DNA Samples

تم تحميل عينات الـ DNA المستخلص كمايلي:

1- أخرجت العينات من جهاز الـ Thermal cycler-.

2- أخذ 10 مايكروليتر من كل عينة من العينات ونزلت كل عينة بحذر داخل الحفرة في هلام الاكاروز المتصلب ابتداء من الحفرة رقم 2، أما الحفرة رقم1 فتم تحميلها بـ 8 مايكروليتر محلول الـ Ladder والمجهز مع عدة الاختبار من قبل شركة BIONEER.

3- غمر هلام الاكاروز تماما بمحلول الترحيل TBE ثم أدخلت الصفيحة Tray في خلية الترحيل الكهربائي.

6- الترحيل الكهربائي Electrophoresis

استخدم مجهز القدرة الكهربائية Power Supplier لتجهيز خلية الترحيل الكهربائي بفرق جهد 40 فولت لمدة1-3 ساعة عند درجة حرارة الغرفة وبعد اكتمال الوقت استخدم جهاز UV-Transilluminator كمصدر للأشعة فوق البنفسجية بطول موجي 256 نانوميتر لفحص مواقع حزم الدنا الكروموسومي والبلازميدي [17,18] وبعد ذلك تم تصوير النتائج باستخدام كاميرا من نوع Sony.

7- التحليل الإحصائي Statistical analysis

تم تحليل البيانات باستعمال البرنامج الاحصائي (SPSS version 10.5 software) حيث استخدم اختبار مربع كاي X2-Square لتحديد الفروقات المعنوية تحت مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ وحسب ماذكر في [19].

النتائج Results

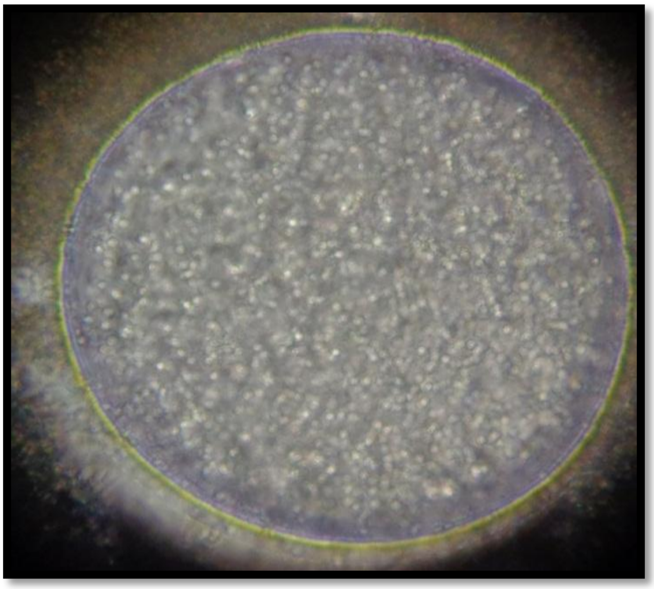
1-الكشف عن أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية في تربة بعض الأحياء السكنية في محافظة الديوانية.

A- طريقة الترسيب Sedimentation method

لم تعطي نتائج فحص 50 عينه تربة من الحدائق المنزلية لعشرة أحياء سكنية من محافظة الديوانية أي نتيجة إيجابية عند استخدام طريقة الترسيب بحثاً عن أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية في تلك العينات.

B - طريقة التطويف Floatation method

أشارت نتائج فحص 50 عينه تربة من الأحياء السكنية في محافظة الديوانية باستخدام طريقة التطويف إلى وجود 5 عينات بنسبة 10% أعطت نتيجة موجبة للفحص باستخدام محلول نترات الصوديوم المشبع NaNO3 ، ضمت عينتان بنسبة 40 % من حي الصدر الأولى وعينه واحدة بنسبة 20% لكل من حي النهضة وحي الوحدة العربية وحي العروبة في حين لم تسجل أي حالة تواجد لأكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية في بقية الأحياء المشمولة بالدراسة، دلت نتائج التحليل الإحصائي إلى وجود ارتفاع معنوي في نسبة تواجد أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية في منطقة الصدر الأولى مقارنة مع بقية الأحياء السكنية تحت مستوى احتمال $P \leq 0.05$. كما مبين في الجدول (1) والصورة (1).



الصورة (1) تبين كيس بيض غير متبوغ لطفيلي المقوسة الكوندية *T.gondii* في عينات التربة بطريقة التطويف 10X باستخدام كاميرا نوع Sony

الجدول (1) أعداد ونسب تواجد أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية في عينات تربة الحدائق المنزلية لبعض الأحياء السكنية في محافظة الديوانية باستخدام طريقة التطويف.

الحي السكني	العدد المفحوص	العدد الموجب	(%)	العدد السالب	(%)
حي الصدر الاولى	5	2	(40) A	3	(60)
حي النهضة	5	1	(20) B	4	(80)
حي الأسكان القديم	5	0	(0) C	5	(100)
حي الوحدة العربية	5	1	(20) B	4	(80)

حي العروبة	5	1	(20) B	4	(80)
حي الفرات	5	0	(0) C	5	(100)
حي الجزائر	5	0	(0) C	5	(100)
حي الحكيم	5	0	(0) C	5	(100)
حي المتقاعدين	5	0	(0) C	5	(100)
حي الجامعة	5	0	(0) C	5	(100)
المجموع	50	5	(10)	45	(90)

تشير الحروف المتشابهة إلى عدم وجود فروقات معنوية في حين تشير الحروف المختلفة إلى وجود فروقات معنوية تحت مستوى احتمالية P≤ 0.05 كما تشير الحروف الكبيرة إلى أن القراءة الاحصائية عمودية.

C- الكشف الجزيئي باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي

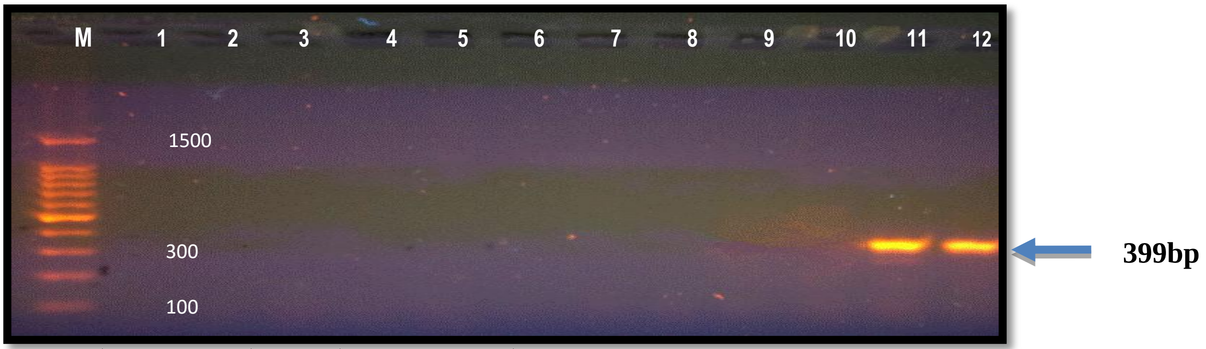
Conventional Polymerase Chain Reaction

أشارت نتائج فحص 50 عينه تربة من الحدائق المنزلية لعشرة أحياء سكنية في محافظة الديوانية باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي إلى أن هناك عينتان فقط أعطت نتيجة إيجابية وبنسبة 4 % ضمت عينه من منطقة حي الصدر الاولى وعينه من منطقة حي الفرات وبنسبة 20% لكل واحدة منهما ولم تسجل أي حالة لتواجد الجينB1 ذو الوزن الجزيئي 399bp الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية في تربة بقية الأحياء السكنية، وأشارت نتائج التحليل الإحصائي إلى وجود فروقات معنوية في نسبة تواجد الجينB1 في تربة حدائق حي الصدر الاولى وحي الفرات عنها في بقية الأحياء السكنية تحت مستوى احتمالية 0.05 ≥P كما مبين في الجدول (2) والصورة (2).

الجدول (2) أعداد ونسب تواجد الجين B1 ذو الوزن الجزيئي 399bp في عينات تربة الحدائق المنزلية لبعض الأحياء السكنية في محافظة الديوانية باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي .

الحي السكني	العدد المفحوص	العدد الموجب	(%)	العدد السالب	(%)
حي الصدر الاولى	5	1	(20) A	4	(80)
حي النهضة	5	0	(0) B	5	(100)
حي الأسكان القديم	5	0	(0) B	5	(100)
حي الوحدة العربية	5	0	(0) B	5	(100)
حي العروبة	5	0	(0) B	5	(100)
حي الفرات	5	1	(20) A	4	(80)
حي الجزائر	5	0	(0) B	5	(100)
حي الحكيم	5	0	(0) B	5	(100)
حي المتقاعدين	5	0	(0) B	5	(100)
حي الجامعة	5	0	(0) B	5	(100)
المجموع	50	2	(4)	48	(96)

تشير الحروف المتشابهة إلى عدم وجود فروقات معنوية في حين تشير الحروف المختلفة إلى وجود فروقات معنوية تحت مستوى احتمالية P≤0.05 كما تشير الحروف الكبيرة إلى أن القراءة الاحصائية عمودية.



الصورة (2): تمثل الاعمدة 11,12 عينات تربة الحدائق المنزلية الموجبة لتفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي حيث يظهر الجين B1 الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية ذو الوزن الجزيئي 399bp اما الاعمدة 1-10 تمثل عينات التربة السالبة، M يمثل Ladder ذو الوزن الجزيئي 1500-100bp.

المناقشة Discussion

1-الكشف عن أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية في عينات تربه الحدائق المنزلية باستخدام طريقتي الترسيب والتطويف

أشارت نتائج فحص عينات تربة الحدائق المنزلية لعشرة أحياء سكنية في محافظة الديوانية باستخدام طريقة الترسيب إلى عدم تسجيل أي حالة موجبه وباستخدام طريقة التطويف إلى وجود 5 عينات موجبة بنسبة 10% باستخدام محلول نترات الصوديوم المشبع$NaNO_3$، أن النسبة المسجلة بالدراسة الحالية هي أقل من النسبة المسجلة من قبل[20] و [21] والبالغة 68% ,20% على التتالي بدراستهما التي تضمنت الكشف عن أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية في تربه الحدائق المنزلية وتربه المزارع بطريقة الترسيب.

يمكن أن يعزى سبب الاختلاف في النسبة المسجلة بالدراسة الحالية والدراسات الأخرى إلى تواجد المضائف النهائية للطفيلي واعدادها وكذلك اختلاف الظروف البيئية والصحية لكل بلد من البلدان ولكل منطقة ضمن البلد الواحد وهذا ما اكدته [21].

أما سبب انخفاض نسبة تواجد أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية بالدراسة الحالية مقارنة مع النسب المسجلة في الدراسات الأخرى، يرجع إلى أن على الرغم من أن طريقة التطويف هي طريقة مهمة في الكشف عن أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية في التربة الا أنها لا تعطي نتيجة موجبة الا عندما تكون تلك العينات تحتوي على الأقل 103 من أكياس بيض الطفيلي [23,22] وأن تؤخذ عينة التربة بعمق مناسب إذ تبقى أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية على السطح بعمق 10cm لكن انتقالها داخل التربة غير معروف في حين تبقى في أسفل الماء نتيجة لكثافتها النوعية البالغة 1.104-1.140 [24] كما تعد طريقة التطويف باستخدام محلول السكروز ذات الكثافة النوعية 1.15< من الطرق الشائعة لتنقية أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية ذات الكثافة 1.104-1.140 من المواد العالقة المعقدة في عينات التربة[25,24] لكن من الصعب جداً التمييز بين أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية وبقية الطفيليات مثل Hommondia sp، Neospora sp إذ تتشابه أكياس هذه الطفيليات إلى حد ما إضافة إلى شيوع تواجدها في البيئة [27,26].

ويمكن أن يعزى سبب تواجد أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية في تربه الحدائق المنزلية، إلى أن الحدائق المنزلية تكون ذات مساحات محدودة كما تعد أماكن مناسبة تطرح فيها القطط فضلاتها مما يؤدي إلى تركيز أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية فيها بشكل عالي وبذلك يزداد خطر إصابة الأنسان بداء المقوسات نتيجة للتلوث الذي قد يحصل، على العكس من الحدائق العامة الذي تكون ذو مساحات واسعة لطرح أكياس بيض الطفيلي مع فضلات القطط المصابة وبذلك تتركز أكياس البيض بصورة أقل من الحالة السابقة لذلك ينخفض خطر الإصابة في المناطق المفتوحة [28].

من الجدير بالذكر أن وجود أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية في التربة يؤكد الدور الهام للقطط في تلوث المزارع والحدائق ونشر الإصابة، إذ تتبوغ أكياس البيض بتوفر درجة الحرارة المناسبة والرطوبة التي تؤدي إلى نضج أكياس البيض وبذلك تصبح معدية وتبقى محتفظة بقابليتها على احداث الإصابة لعدة شهور أو سنوات وغالباً ما تتواجد أكياس البيض فوق سطح التربة عند هطول الأمطار وهذا ما ذكره [29] .

3 - الكشف عن الجين B1 (399bp) الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية في عينات تربه الحدائق المنزلية باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي

في السنوات الأخيرة استخدمت طرق تشخيصية حديثة للتحري عن أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية في التربة ومن تلك الطرق هي تقنية سلسلة البلمرة الاعتيادي بسبب الخصوصية والحساسية العاليتين لهذه التقنية [31,30].

أشارت نتائج الدراسة الحالية التي تضمنت فحص50 عينة تربه من الحدائق المنزلية لعشرة احياء سكنية في محافظة الديوانية باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي إلى أن هناك عينتان وبنسبة 4% أعطت نتيجة إيجابية ضمت عينة من منطقة حي الصدر الاول وعينه من منطقة حي الفرات وبنسبة 20% لكل واحدة منهما ولم تسجل أي حالة لتواجد الجينB1(399bp) الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية في تربه بقية الاحياء المشمولة بالدراسة الحالية.

أن النسبة المسجلة بالدراسة الحالية هي أقل من النسب 10%,17.8% التي ذكرها كل من [15] و[32] في دراساتهما التي تضمنت الكشف عن أكياس بيض طفيلي المقوسة الكوندية في عينات التربة باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي.

وقد يرجع سبب انخفاض النسبة المسجلة في الدراسة الحالية إلى أن استخدام طريقة تفاعل سلسلة البلمرة في تشخيص أكياس بيض طفيلي المقوسة صعب نوعا ما في التربة مقارنة باستخدامها في تشخيص الطفيلي في أنسجة وسوائل جسم المضائف والتي تعتمد على تضخيم الجينB1 [33]وترجع اسباب ذلك إلى كون استخلاص الدنا الطفيلي من عينات التربة صعب جداً إضافة إلى كون المكونات البيئية الموجودة في التربة تعمل على تثبيط تفاعل سلسلة البلمرة [34] ومن تلك المثبطات هو حامض Humic acid والطين والسكريات المتعددة [36,35].

Detection of Toxoplasma *gondii* in the soil of the home gardens of some residential neighborhoods in the city of Diwaniyah.

Prof. Dr. Hadi M. Hamza Al-Maily[1]   Prof. Dr. Khairy A. Dawood Al-Egali[2]
Khadeeja.A.Hmood AL-khalidi[3]

1-University of Qadisiyah / Faculty of Education
2-University of Qadisiya / Faculty of Medicine
3 - University of Qadisiyah / Faculty of Science

Abstract

The study was included the detection Oocysts of T.gondii in soil samples of ten cities from Al-Diwania province such as first Al-suder district, Al Nahda neighborhood, Al-Furat neighborhood, Al-Wahda Al-Arabiya neighborhood, old al'iiskan neighborhood, Al-Hakim neighbor- rhood, Al-Orouba neighborhood, Algiers neighborhood, Almutaqaeidin neighborhood, university neighborhood during the period from July 2011 to August 2013, by using sedimentation and floatation methods as primarily diagnosis, also using the polymerase chain reaction to detect of B1gene in these samples.

The result were referred to, in the soil samples, the percentage of presence of Oocysts of *T.gondii* was %10 by using floatation method and %4 by conventional Polymerase Chain Reaction.

Key words :polymerase chain reaction, *Toxoplasma gondii ,Soil pollution, precipitation, sedimentation*

Khadeeja.abees@qu.edu.iq

References المصادر

1-Remington, J. S. & Gentry, L. O. (1970). Acquired toxoplasmosis: infection versus disease. Ann. N. Yacad .Sci., 174: 1006- 1017.

2-Hill, D. & Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii* transmission, diagnosis and prevention. Clin. Microbiol Infect.,V. (8): 634- 640.

3-Monotoya, J. & Remington, J. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. Clin. Pract., 47(15): 554-566.

4-Remington, J.S.; Meleod, R. & Desmots G. (1995).Toxoplasmosis in Regmington, J.S, klicn Ioeds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4th Ed. phila delphia: WB Saunders. 140-267.

5-Lambourn, D. M.; Jeffries, S. J. & Dubey. J. P. (2001). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in harbor seals, phocavitulina in southern PugetSound Washington. J. parasitol. V. (87): 1996- 1197.

6-Foulon,W.; Villena, I.; &Stray-Pedersen, B. (1999).Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: amultinuclear study of impact on fetal transmission and childrens squelae at age 1year. Am. J. Obstet. Gynecol.,180: 410-415

7-Dubey, J. P. (2002). Toxoplasma gondii; Httm. Gsbs. Atmbedil microbookl Ch. 84. htm.

8-Tenter, A. M.; Heckeroth, A. R. & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii* from animals to human . Inter. J. Parasitol., 30: 1247- 1258

9-Dubey, J. P. (1973). Feline toxoplasmosis and coccidiosis:Asurvey of domiciled and stray cats. J. Amer .Vet. Med. Ass.,162: 873-77.

10-Slavin, M. A. & Mayers, J. D. (1994). *Toxoplasma gondii* infection in marrow transplantation recipients: a 20 year experience. Bone marrow transplant, 13: 549-557.

11-Lynfield, R. & Nicholas, G.(1997).Toxoplasmosis. Pediat. InRev.,18(3) :75-85.

12-Desmonts, G. & Remington J. S. (1980). Direct agglutination test fordiagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity , J. Clin Microb.,11: 562-8.

13-Dubey, G. V.; Swan, L. & Frenkel, J. K. (1972). A simplified method for isolate on of Toxoplasma gondii from the feces of cats. J. Parasitol., 58:1005- 1006 .

14-Mizgajska-Wiktor, H. (2005). Recommended method for recovery of Toxocara and other geohelminth eggs from soil.Wiad.

15-Junji, M.; Daisuke, K.; Shiba, K.; & Shoji, U. (2004). Detection of Toxoplasma Oocysts from soil by modified sucrose flotation and PCR methods. Vol. 35 (2): 270-274.

16-Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis,T. (1989). Molcular cloning:alaboratory manual. 2nd.Ed. Gold spring harbor. NewYork. USA. (Cited by ALKhled, M. J. A. (2012).

17-Struelens, M. J.; Deplano, A; & Serruys E. (1992). Epidemilogical typing and delineation of genetic relatedness of methicillin resistant Staphylococcus aureus. J.Clin. Microbiol.,30: 2519- 2602.

18-Mary, E. K. (1998). Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Molecular Bacteriology. Central public health laboratory, London, UK., 3: 33-50.

19-Niazi, A. D. (2001). Statistical analysis in medical research..Uni. Nahrei Republic of Iraq. 148

20-Coutinho, S. G.; Lobo, R.; Dutra, G. (1980). Isolation of *Toxoplasma* from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in an rural area in Brazil. J. Parasitol., 68 (5): 866 – 868.

21-أغوان ، سرى سالم عبد الرزاق.(2005).التحري عن بعض مصادر العدوى ودراسة التأثيـــــرات المناعية والمرضية لطفيلي المقوسة الكونديةT. gondii.أطروحة دكتـوراه كليـــة الطـــب البيطري،جامعة الموصل.174 صفحة.

22-Dumetre, A. & Darde, M. L. (2003). How to detect *Toxoplasma gondii* Oocyst in environment samples fems. Microbiol. Rev., 27(5):651-661.

23-Afonso, E.; Lemoine, M.; Poulle, M.; Ravat, M.; Romand, S.; Thulliez, P.; Vill ena, I.; Aubert, D.; Rabilloud, M.; Riche, B.;& Gilot Fromont, E. (2006) .Spatial distribution of soil contamina tion by Toxoplasma gondii in relation to cat defecation behavior in an urban area. Int. J. parasitol., 38:1017-1023.

24-Dubey, J. P.; Miller, N. L. & Freskel, J. K. (1970).The *Toxoplasma gondii* Oocysts From cat feces. J. Exper. Med.,13:36-662.

25-Dubey, J. P. & Beattie, C. P. (1988).Toxoplasmosis of Animals and Man. CRC press, Boca Rotan, FL, U. S. A, 20.

26-Frenkel, J. K.; Ruiz, A.; Chinchilla, M. (1975). Soil survival of Toxoplasma oocysts in Kansas and Costa Rica. Am. J.Trop. Med. Hyg., 24: 439-443.

27-Dubey, J. P.; Graham, D. H.; Blackston, C. R.; Lehman,T.; Gennar, S M.; Rago zo, A. M. A.; Nishi, S. M.; Shen, S. K.; Kwork, O C. H; Hill, E. &Thulliezd, P. (2002). Biological and genetic characterization of Paulo, Brazil. Int. J. Parasito l., 32: 99-105.

28-Diaz-Suarez, O. & Estevez, J. (2009). Seroepidemiology of toxoplasmosis in women of childbearing age from a marginal community of Maracaibo,Vene zuela. Rev Inst. Trop .Sao Paulo., 51(1):13-7.

29-Kapperud, G.; Jenum, P. A.; Pedersen, B. S.; Melby, Eskild, A. & Eng, J. (1996).Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Am. J. Epidemiol.,144 (4): 405-412.

30-Grover, C. M.;Thulliez, P.; Remington, J. S. & Boothroyed, J. D. (1990).Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid J.Clin. Microboil., 28: 2297-2301.

31-Lebech, M.; Lebech, A.M.; Nelsing, S.; Vuust, J.; Mathiesen, L.; Petesen, E.(1992). Detection of Toxoplasma gondii DNA by polymer ase chain reaction in cerebrospinal fluid from AIDS patients with cerebral toxoplasmosis. J. Infect Dis., 165: 982-3.

32-Lass, A.; Pietkiewicz, H.; Modzelewska, E.; Dumetre, A. & Myjak. P. (2009) . Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmenttal soil samples using molecular methods. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.,V. (28): 599-605.

33-Ellis, J.T. (1998). Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol., 28: 1053-1060.
.
34-Zhao, X.; Duszynski, D.W.; Loker, E. S. (2001). A simple method of DNA extraction for Eimeria species. J. Microbiol., Methods, 44,131-137.

35-Wiedenmann, A.; Kruger, P.; Botzenhart, K. (1998). PCR detection of *Cryptosporidium pavum* in environmental samples-areview of published protocols and current development. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 21:150-166.

36-Chung, E.; Aldom, J. E.; Chagla, A. H.; Kostrzynska, M.; Leem, H.; Palmateer, G.;Trevors, J.T.; Unger, S. & De Grandis, S. (1998). Detection of Crypto sporidium parvum oocysts in municipal water samples by the Polymera se Chain Reaction. J. Miccrobiol., 33:171-180.