

دراسة تشخيصية لطيفي *Giardialamblia* المرافق لتلوث مياه الشرب في بعض الاحياء السكنية في مدينة الديوانية باستخدام طريقة التطويق وتقنية تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي.

تاريخ القبول: 2015/4/26

تاريخ الاستلام: 2015/3/5

خديجة عبيس حمود الخالدي/جامعة القادسية/ كلية العلوم  
[Khadeeja.abees@qu.edu.iq](mailto: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 التطويق لغرض فحص العينات وتشخيص طيفي الـ *Giardialamblia*، اذ اشارت النتائج الى ان نسبة تلوث مياه الشرب بالطيفي في الاحياء المذكورة بلغت 22.85% بواقع 32 عينة 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 التشخيصي *Giardin* ذو الوزن الجزيئي 218bp الخاص بطيفي الـ *G.lamblia* باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي الى ان نسبة تلوث مياه الشرب بطيفي *G.lamblia* بلغت 5.71% بواقع 8 عينات.

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

Microbiology Classification QR – 74.5

### المقدمة :-

الضوء على اهم المسببات المرضية التي تنتقل الى الانسان عن طريقه ومن تلك الدراسات مايلي:

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

كما تمكن الباحث (5) من فحص 54 عينة من المياه السطحية الطبيعية وأشار الى وجود 4 عينات احتوت على طيفي *Cryptosporidium* وعينة واحدة احتوت على طيفي *Giardia lamblia*.

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

كما ذكر (7) في دراسته التي تضمنت فحص 275 عينة مياه البحر، بأن نسبة تلوث تلك العينات بالطيفيات كانت 81% مسجلا عدة انواع منها *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba coli*. في دراسة مسحية اجراها الباحث (8) للتحري عن الطفيليات الملوثة لمياه الشرب المفتره توصل الى ان هناك 17% (0.29-69 cysts/ 100L) من العينات كانت ملوثة بالطيفيات المعوية شملت طيفي *G.*

تنتشر في بيئة الانسان انواع كثيرة من الاحياء التي قد تكون مفيدة او ضارة ومنها الطفيليات، الفايروسات، البكتيريا، الفطريات، وبعض هذه الاحياء مفيدة وهامة لحياء 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 ومعديّة 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 بالطيفيات 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 *Iso spora belli*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*. *Cryptosporidium* (3).

ولأهمية الماء في الحياة العامة فقد حضي باهتمام الكثير من الباحثين من خلال قيامهم بعدة دراسات لتسليط

الاحياء السكنية في مدينة الديوانية لكون هذا الطفيلي اكثر الاوالي الحيوانية انتشاراً وإمراضيه للإنسان لكون الكيس Cysts هو الطور البيئي الأكثر مقاومة اذ تصل مدة بقاءه في البيئة والمياه السطحية الى عدة شهور ومن ثم تنتقل الى الانسان بطريقة مباشرة او غير مباشرة (9).

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 المجهرىوالجزيئي.

1- استخلاص Extraction الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA من العينات.  
2- تضاعف Amplification الحامض النووي منقوص الاوكسجين باستخدام البادئات Primers الخاصة بطفيلي *G. lamblia*.

PCR وحسب تسلسلها النيكلوتيدي الذي ورد في (14,13,12) وقد تم تجهيز البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية.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`TTTGTGAGCGCTTCTGTCTGGCAGCGCTAA`3	

AccuPower® 2X GreenStar™ PCR Master Mix وكذلك من

خلال حساب درجة الـ Tm البادئات وذلك باستخدام جهاز الـ MiniOpticon PCR system BioRad. USA كما في الشكل ادنى:

*lamblia, Hymenolepis nana, Blastocystis hominis, 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

المواد وطرائق العمل

1- جمع العينات  
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

2- الكشف عن الطفيليات

بحثاً عن ايكياس طفيلي *G. lamblia* في عينات مياه الشرب استخدمت طريقة التطويق وحسب مذكرت في (10) وتقنية تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي Conventional-PCR واجريت 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-

4- حالات الدورات الحرارية PCR  
Thermocycler conditions تم تطبيق الدورات الحرارية لفحص الـ PCR وذلك بالاعتماد على تعليمات عدة

5- طريقة اختبار تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي conventional PCR  
خُصِر مزيج التفاعل باستخدام عدة الـ AccuPower PCR Premix المجهزة من قبل شركة الـ BIONEER الكورية وحسب تعليمات الشركة:

PCR step	Temperature	Time	Repeat cycle
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		12 µl
Total		20 µl

#### 6-التحليل الاحصائي Statistical analysis

تم تحليل البيانات باستعمال البرنامج الاحصائي SPSS (version 10.5 software) حيث استخدم اختبار مربع كاي

X<sup>2</sup>-Square لتحديد الفروقات المعنوية تحت مستوى احتمالية P≤0.05 وحسب مذكره (15).

#### النتائج والمناقشة

اشارت نتائج الدراسة الحالية باستخدام طريقة التطوير 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 النسب 77.7%، 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 أكدته (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 التوالي واول نسبة كانت 5% سجلت في عينات مياه كل من حي الحكيم وحي التقية وشارت نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروق معنوية في نسب تلوث مياه الشرب بين

الاحياء السكنية تحت مستوى احتمالية P≤0.05 وكما مبين في الجدول رقم (3).

$$X^2 \text{ المحسوبة} = 6.127 \quad X^2 \text{ الجدولية} = 3.625$$

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.

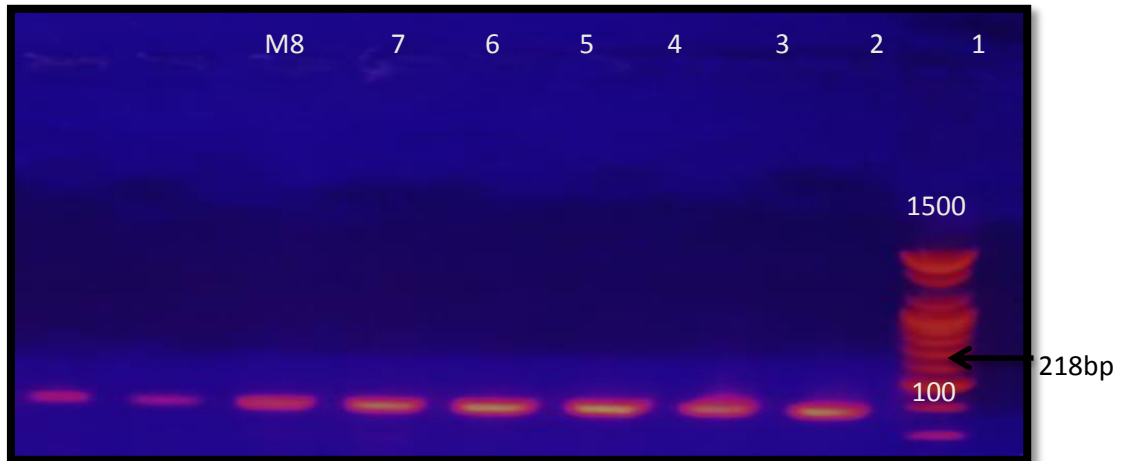
ولغرض تأكيد تشخيص طفيلي *G. lamblia* في مياه الشرب استخدمت تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي Conventional-PCR للتحري عن الجين Giardin ذو الوزن الجزيئي 218bp في 140 عينة من مياه الشرب، اذ لوحظ هناك 8 عينات اعطت نتيجة موجبة وبنسبة 5.71% وكما موضح في الصورة رقم (1)، من خلال النسب المسجلة في الدراسة الحالية يمكن القول بأن التشخيص باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي هو الافضل والاكثر دقة في 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 التطوير 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 *Giardia* لذلك كانت نسبة التلوث

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

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 التطوير 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 يظهر الجين *Gairdin* ذو الوزن الجزيئي 218bp الخاص بطفيلي *G.lambli*a في ثماني عينات ، العمود M يمثل Ladder ذو الوزن الجزيئي 1500-100 bp .

المصادر :-

- 5-Rimhanen-Fiune R, Horman A, Ronkainen P, Hanninen ML. (2002). An IC-PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface water in Finland. J Microbiol. 50(3):299-303.
- 6-Hosseini doost, S. R. (1997). Water parasitic contamination in Tehran hospitals ,2<sup>nd</sup> National Congress of Iran parasitic diseases, Tehran, 19-22.
- 7- Tamburrini ,A. Pozio, E. (1999). Long-term survival of *cryptosporidium parvum* Oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Int .J. Parasitol. 29:711-5.
- 8- Paul, R. Hunter, ,(2001). Waterborne disease epidemiology and ecology 2<sup>nd</sup> Wiley and Sons:1-93.
- 9-Dawson, D. (2005). Foodborne protozoan parasites. International Journal of Food Microbiology ,103: 207- 227.
- 10- باكر، ج. (1973). الاوالي الطفيلية. ترجمة الالوسي، توفيق ابراهيم. كلية الطب البيطري. جامعة الموصل. الصفحة:
- 89 -8611-Jiang, J., Alderisio, K. A., Sinagh, A., and Xiao, L. (2004). Development of Procedures for Direct Extraction of *Cryptosporidium* DNA from Water Concentrates 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 of Environmental Health Research, 7: 63 – 69.
- 13-Rochelle, P. A., Leon, R. D., Stewart, M. H and Wolef, R. (1997). Comparison of Primers and ptimization of PCR Conditions for Detection of *C. parvum* and *G.lambliia* 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* from other *Giardia spp.* by using polymerase chain reaction and gene probes. J. Clin. Microbiol. 30:74–78.
- 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 *Cryptosporidium spp.* In filtered drinking water supplies. Appl. Environ. Microbiol. 57:2617-26215.
- 17- Verweij, J. J., Blange, R. A., Temp- leton, K., Schinkel, J., Brienens, E. A., vanRooyen, M. A., van Lieshout, L., Polderman, A. M. (2004). Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. J Clin Microbiol. 42, 1220-1223.
- 18- Lebbad, M. (2010). Molecular Diagnosis and Characterization of two intestinal Protozoa: *E. histolytica* & *Giardia intestinalis*. Swedish institute for Infectious diseases control, thesis .Ph.D. Microbiology .Tumor and cell Biology. Karolinska institutet 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

**Khadeeja Abees Hmood.  
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**