

التشخيص الجزيئي لطيفلي جيارديا الأمعاء *Giardia intestinalis* في الأطفال المصابين بالإسهال باستخدام تقنية Real-Time PCR

د.هادي مدلول الميالي ، لبنى عبد القادر الأبراهيمي
Lubna_a_k@yahoo.com

قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة القادسية

الخلاصة

أجريت الدراسة الحالية خلال المدة من 2012 /11/1 ولغاية 2013/6/30 للتحري عن نسبة انتشار طفيلي الجيارديا عند الأطفال المصابين بالإسهال واللفئات العمرية (≥ 1 - 12 سنة) حصراً في محافظة الديوانية باستعمال الفحص المجهرى وتفاعل السلسلة المتبلمرة بالوقت الحقيقي Real-Time PCR . أظهرت نتائج الدراسة أن نسبة الإصابة الكلية كانت 5.61% (52 عينة من مجموع 926 عينة) ، بالمسحة المباشرة الرطبة وطريقة التطويق ، حيث أظهرت نتائج الفحص المجهرى للعينات أن نسبة الإصابة بين الذكور 6.12% كانت أعلى منها في الإناث 5.11% ، وسجلت أعلى نسبة إصابة 13.87% في الفئة العمرية 2-4 سنوات ، وأقل نسبة في الفئة العمرية 8-10 سنوات وبلغت 1.52% ، وأعلى نسبة للإصابة في شهر حزيران 10.37% وأقل نسبة في شهر كانون الثاني 1.92% ، سجلت أعلى نسبة بين سكان المناطق الريفية وكانت 7.07% مقارنة مع سكان المناطق الحضرية والتي بلغت 4.45% ، وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال $P < 0.05$. وقد بينت نتائج استخلاص الحمض النووي DNA لـ 52 عينة موجبة بالفحص المجهرى إلى احتواء 38 عينة منها على المادة الوراثية لطفيلي وبنسبة 73.07% حيث أظهر التحليل الإحصائي لنتائج المسح بالاعتماد على تقنية الـ Real-Time PCR إلى وجود فروق معنوية في الإصابة بين الفئات العمرية حيث سجلت الفئة العمرية 2-4 سنوات أعلى نسبة للإصابة 83.33% بينما لم تظهر نتائج التحليل الإحصائي فروقا معنوية للإصابة حسب الجنس والتي بلغت في الذكور 75% و بالإناث 70.83% ، كذلك لم تظهر فروقا معنوية بحسب مناطق السكن والتي بلغت بين سكان المناطق الريفية 75.86% مقارنة مع المناطق الحضرية والتي كانت 69.56% وقد أظهرت الدراسة الحالية وجود علاقة وثيقة بين حالات الإسهال والإصابة بطفيلي الجيارديا لامليليا .

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني .

المقدمة Introduction

الجيارديا لامليليا *G.lamblia* هي واحدة من بين الأبتديانيات المعوية الأكثر انتشاراً حول العالم حيث يكون تأثيرها في المقام الأول على الأطفال في كل من البلدان المتطورة والنامية ، حيث تتراوح نسب الإصابة بين 2-5% في البلدان الصناعية وقد تفوق 30% في البلدان النامية (1) . يسبب هذا الطفيلي داء الجيارديات Giardiasis وهو احد مسببات الإسهال غير الفايروسي الأكثر شيوعاً بين الأطفال التي دورها تؤدي إلى مشاكل صحية كبيرة مثل : سوء الامتصاص ، وفقدان الوزن التي تؤدي إلى التأخير في النمو والتطور (2) . تفاعلات السلسلة المتبلمرة في الوقت الحقيقي Real-Time PCR هي تعديل لتفاعلات PCR التقليدي Convintinal PCR والذي يستعمل لتضخيم وقياس جزئي الحمض النووي المستهدف في الوقت نفسه ومن هنا جاءت التسمية ويتم رصد التضخم للتسلسل الهدف بالوقت الحقيقي باستعمال تكنولوجيا الفلورسنت (3) . وان القدرة على رصد التضخم للحمض النووي بالوقت الحقيقي يتم بعدة التقنيات هي : المجسات العقرية Scorpion probes ، المرشحات الجزيئية Molecular Beacons ، ومجسات التحلل (Taq Man) Hydrolysis probes و صبغة سايبير الخضراء SYBR Green المستعملة في الدراسة الحالية وهي الصبغة الأكثر استعمالاً في تفاعلات (Real-Time PCR) حيث ترتبط إلى الحمض النووي مزدوج الشريط (dsDNA) double – stranded DNA (4)

أهداف الدراسة

التعرف على مدى انتشار الإصابة بطفيلي الجيارديا في محافظة الديوانية وتأكد التشخيص في عينات الغائط الموجبة بالفحص المجهرى باستخدام تقنية السلسلة المتبلمرة بالوقت الحقيقي Real-Time/ PCR باستعمال جين small subunit ribosomal RNA (SSUrRNA) .

الكلمات المفتاحية: جيارديا الأمعاء، *Giardia.intestinalis*، Real-Time pcr

المواد وطرق العمل Material and Methods

خلال المدة 2012/11/1 ولغاية 2013/6/30 تم جمع وفحص 926 عينة غائط من الأطفال المراجعين إلى مستشفى الديوانية العام ومستشفى الولادة والأطفال تضمنت عينات من كلا الجنسين واللفئات العمرية (≥ 1 - 12 سنة) . وضعت عينات الغائط في أوعية بلاستيكية محكمة ونظيفة ، فحصت العينات خلال مدة لا تتجاوز نصف ساعة من الحصول عليها

بالمجهر الضوئي بأستعمال المسحة المباشرة الرطبة وطريقة التطوير وحسب (5) للبحث عن الأطوار المتغذية والمتكيسة لطفيلي الجيارديا ، والعينات موجبة الفحص المجهرية تم حفظها من دون إضافة مواد حافظة بدرجة حرارة - 20 م° لحين بدء عملية أستخلاص الـDNA منها وأخضاعها لتقنية الـ Real-time PCR في مختبر الأمراض المشتركة/كلية الطب البيطري.

1- الـ Kits

- أ- عدة استخلاص الحمض النووي Stool DNA extraction kit .
ب- عدة فحص PCR Master Mix Real-Time PCR qPCRTM AccuPower® 2X GreenStarTM .

2. الـ Primers

تم تصميم الـ primers الخاصة بجين (ssuRNA) المسؤول عن تشخيص طفيلي الجيارديا في عينات غائط الأطفال وذلك بأستخدام موقع بنك الجينات Gene Code FN252290 Genebank-NCBI لأستخراج التسلسل الكامل للجين وبأستخدام برنامج Primer3plus لتصميمه وأستعماله في فحص الـ Real-Time PCR وتم تجهيز الـ primers من قبل شركة Bioneer الكورية:

الجدول (1): يمثل الـ primers المستخدمة في الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي وناتج فحص PCR.

Primer	Sequence		PCR product Size
ssuRNA	F	ACG GGT GAA ACA GGA TGA TCC	73bp
	R	TGA TTG ACA GAG GCG GTC TTG	

طريقة التشخيص بأستخدام فحص Real-Time PCR

تم إجراء فحص Real-Time PCR وذلك للتحري عن طفيلي الجيارديا لامبليا *G. lamblia* وذلك بأستخدام الـ ssuRNA الخاصة بتشخيص الطفيلي وحسب (6) يتكون الفحص من عدة خطوات:

1. استخلاص الحمض النووي من البراز Extraction DNA from Stool

تم إجراء استخلاص الحمض النووي من عينات غائط الأطفال وذلك بأستعمال عدة الاستخلاص الخاصة بالغايط (Stool Genomic DNA extraction kit) المجهزة من شركة Bioneer الكورية وتم إجراء الاستخلاص حسب تعليمات الشركة وبالأعتماد على (7) .

2. فحص الحمض النووي المستخلص DNA profile

تم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص من عينات الغائط وذلك من خلال استخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) الخاص بالكشف وقياس تركيز الأحماض النووية DNA and RNA) حيث يتم الكشف الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي (ng/μl) DNA وقياس نقاوة الحمض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين (260-280nm) .

3. تحضير مزيج Real-Time PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل Real-Time PCR بأستعمال عدة الـ qPCRTM AccuPower® 2X GreenStarTM Master Mix المجهزة من قبل شركة الـ Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة ، كما في الجدول (3).

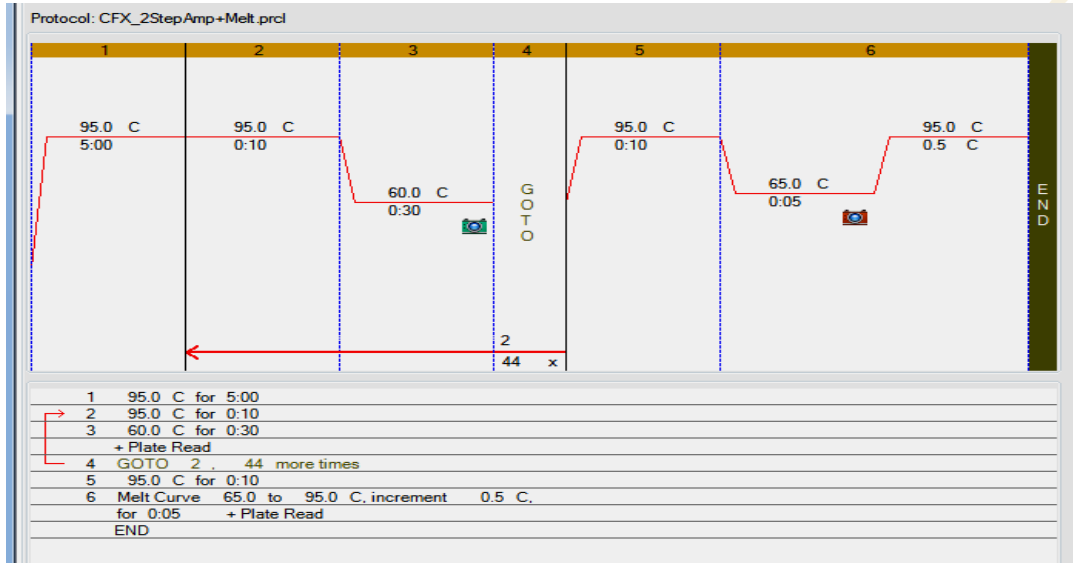
الجدول (2) يمثل مزيج تفاعل Real-Time PCR

PCR master mix	Volume
2X Green star master mix	25 μL
DNA template	5μL
SsuRNA forward primer 10pmol	1μL
SsuRNA reverse primer 10pmol	1μL
DEPC water	18μL
Total	50μL

بعد ذلك وضعت مكونات مزيج تفاعل Real-Time PCR التي ذكرت في الجدول أعلاه في أنابيب بيضاء معتمدة حجم 0.2ml خاصة بجهاز الـ Real-Time PCR ثم نقلت جميع الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge (Exispin) بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة ثلاث دقائق و تم وضعت في جهاز Real-Time PCR .
4. الدورات الحرارية لتفاعل السلسلة المتبلورة في الوقت الحقيقي

Real-Time PCR Thermo cycler conditions

تم تطبيق الدورات الحرارية لفحص الـ Real-Time PCR وذلك بالاعتماد على تعليمات عدة AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master Mix وكذلك من خلال حساب درجة حرارة البادئات T_m و باستعمال جهاز الـ MiniOpticon Real-Time PCR system BioRad. USA كما في الشكل (1) أدناه:



الشكل (1) ظروف التفاعل لتقنية Real-Time PCR

5. تحليل نتائج فحص الـ Real-Time PCR

تم تحليل نتائج فحص الـ Real-Time PCR وذلك من خلال منحى التضخم Amplification plot المعتمد على رقم خط جهد العتبة Threshold cycle number (CT) value حيث تكون العينة موجبة عندما تتجاوز خط العتبة وكذلك تم تحديد خصوصية الفحص للعينات الموجبة من خلال منحى الانصهار melt curve حيث تكون العينات موجبة إذا كان ظهورها في درجة الانصهار نفسها والتي تتراوح في التضخم الحقيقي للجين من $80-90^{\circ}\text{C}$ T_m .

6- التحليل الإحصائي

استعمل اختبار مربع كاي Chi- square لبيان العلاقة بين نسب الإصابة بطفيلي الجiardia وعلاقتها بالجنس والفئة العمرية والسكن وأشهر السنة (8).

النتائج Result

نسبة الإصابة الكلية بطفيلي الجiardia لامبليا *G.lamblia* بوساطة الفحص المجهرى بالمسحة المباشرة الرطبة وطريقة التطوير فحصت 926 عينة غائظ بوساطة الفحص المجهرى بالمسحة المباشرة الرطبة وطريقة التطوير وتبين أن 52 عينة (5.61%) كانت تحتوي على الطور المتغذي أو الطور المتكيس للطفيلي.

نسبة الإصابة بطفيلي *G.lamblia* تبعاً للجنس بطريقة الفحص المجهرى

سجلت الدراسة الحالية انتشار الإصابة في كلا الجنسين بنسبة 5.61% و كانت أعلى في الذكور حيث بلغت 6.12% (28 إصابة) في حين بلغت في الإناث 5.11% (24 إصابة) وقد لوحظ وجود فروق معنوية في نسب الإصابة بين الجنسين عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ كما يظهر في الجدول (4).

الجدول (3) نسبة الإصابة بطفيلي *G.lambli* تبعاً للجنس بطريقة الفحص المجهرى.

الجنس	العدد المفحوص	عدد المصابين	النسبة المئوية للإصابة (%)
ذكور	457	28	*6.12
إناث	469	24	5.11
المجموع	926	52	5.61

X^2 المحسوبة = 7.525

X^2 الجدولية = 0.006

* توجد فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

نسبة الإصابة بطفيلي *G.lambli* تبعاً إلى الفئة العمرية بطريقة الفحص المجهرى
سجلت الدراسة الحالية ظهور الإصابة في مختلف الفئات العمرية من ≥ 1 - 12 سنة ، و بلغت أعلى نسبة إصابة في الفئة العمرية 2- 4 سنوات وكانت 13.87% (24 إصابة) وأدنى نسبة إصابة في الفئة العمرية 8-10 سنوات وبلغت 1.52% (2 إصابة) وقد لوحظ وجود فروق معنوية في نسب الإصابة بين الفئات العمرية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ كما يبين الجدول (5).

الجدول (4) نسبة الإصابة بطفيلي *G.lambli* تبعاً إلى الفئة العمرية باستعمال الفحص المجهرى.

الفئة العمرية (سنة)	عدد المصابين	النسبة المئوية للإصابة (%)
أقل من سنتين	10	6.09
2- 4	24	*13.87
4- 6	9	5.08
6- 8	3	2.08
8- 10	2	1.52
10- 12	4	2.91
المجموع	52	5.61

X^2 المحسوبة = 64

X^2 الجدولية = 0.01

* توجد فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

نسبة الإصابة بطفيلي *G.lambli* تبعاً لموقع السكن بطريقة الفحص المجهرى
بينت نتائج الدراسة الحالية وجود اختلافات في نسب الإصابة بالجيارديا بحسب مناطق السكن في محافظة الديوانية إذ بلغت أعلى نسب للإصابة في المناطق الريفية (7.07%) وأدنى نسبة كانت في المدينة (4.45%) وقد لوحظ وجود فروق معنوية في نسب الإصابة بين مواقع السكن عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ وكما في الجدول (6).

الجدول (5) نسبة الإصابة بطفيلي *G.lambli* تبعاً لموقع السكن بطريقة الفحص المجهرى.

موقع السكن	العدد المفحوص	عدد المصابين	النسبة المئوية للإصابة (%)
ريف	410	29	*7.07
مدينة	516	23	4.45
المجموع	926	52	5.61

X^2 المحسوبة = 49.54

X^2 الجدولية = 1.90

* توجد فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

نسبة الإصابة بطفيلي *G.lambli* تبعاً لأشهر السنة بطريقة الفحص المجهرى

سجلت الدراسة الحالية الإصابة في كل أشهر الدراسة و كانت أعلى نسبة في شهر حزيران حيث بلغت 14 إصابة (10.37%) في حين بلغت في شهر كانون الثاني 2 إصابة (1.92%) وقد لوحظ وجود فروق معنوية في نسب الإصابة بين الأشهر عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ كما في الجدول (7).

الجدول (6) نسبة الإصابة بطفيلي *G.lamblia* تبعاً لأشهر السنة باستعمال الفحص المجهرى.

الشهر	العدد المفحوص	عدد المصابين	النسبة المئوية للإصابة (%)
تشرين الثاني	87	4	4.59
كانون الأول	109	4	3.66
كانون الثاني	104	2	1.92
شباط	92	3	3.26
آذار	103	4	3.88
نيسان	157	9	5.73
أيار	139	12	8.63
حزيران	135	14	*10.37
المجموع	926	52	5.61

$$X^2 \text{ المحسوبة} = 275.4$$

$$X^2 \text{ الجدولية} = 0.01$$

* توجد فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

نسبة الإصابة بطفيلي *G.lamblia* باستعمال تقنية Real-Time PCR

سجلت الدراسة الحالية الإصابة بطفيلي الجيارديا في 38 عينة (73.07%) من أصل 52 عينة موجبة بالفحص المجهرى وأخضعت لتقنية Real-Time PCR الأشكال (2 إلى 6) حيث توضح الأشكال خصوصية الجين ssurRNA في العينات المفحوصة وجود قمة واحدة خلال الفحص يؤكد وجود جين واحد ضمن الفحص خلال ارتفاع درجات الحرارة.

نسبة الإصابة بطفيلي *G.lamblia* تبعاً للجنس باستعمال تقنية Real-Time PCR

بينت نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة للإصابة كانت عند الذكور إذ بلغت 75% بالمقارنة مع الإناث والتي بلغت 70.83% وقد لوحظ عدم وجود فروق معنوية في نسب الإصابة بين الجنسين عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ كما في الجدول (8).

الجدول (7): نسبة الإصابة بطفيلي *G.lamblia* تبعاً للجنس باستعمال تقنية Real-Time PCR.

الجنس	العدد المفحوص	عدد المصابين	النسبة المئوية للإصابة %
ذكور	28	21	75
إناث	24	17	70.83
المجموع	52	38	73.07

$$X^2 \text{ المحسوبة} = 0.042$$

$$X^2 \text{ الجدولية} = 0.837$$

* لا توجد فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

نسبة الإصابة بطفيلي *G.lamblia* تبعاً للفئة العمرية باستعمال تقنية Real-Time PCR

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة للإصابة كانت في الفئة العمرية 2-4 سنوات إذ بلغت 83.33% وأقل نسبة للإصابة كانت في الفئات العمرية 8-10 سنوات و 10-12 سنة وبنسبة إصابة بلغت 50% لكلا الفئتين وقد لوحظ وجود فروق معنوية في نسب الإصابة بين الفئات العمرية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ وكما في الجدول (9).

الجدول (8) نسبة الإصابة بطفيلي *G.lamblia* تبعاً للفئة العمرية باستعمال تقنية Real-Time PCR

الفئة العمرية (سنة)	عدد المفحوصين	عدد المصابين	النسبة المئوية للإصابة (%)
أقل من سنتين	10	8	80
2-4	24	20	*83.33
4-6	9	7	77.77
6-8	3	-	0.0
8-10	2	1	50
10-12	4	2	50
المجموع	52	38	73.07

$$X^2 \text{ المحسوبة} = 28.8$$

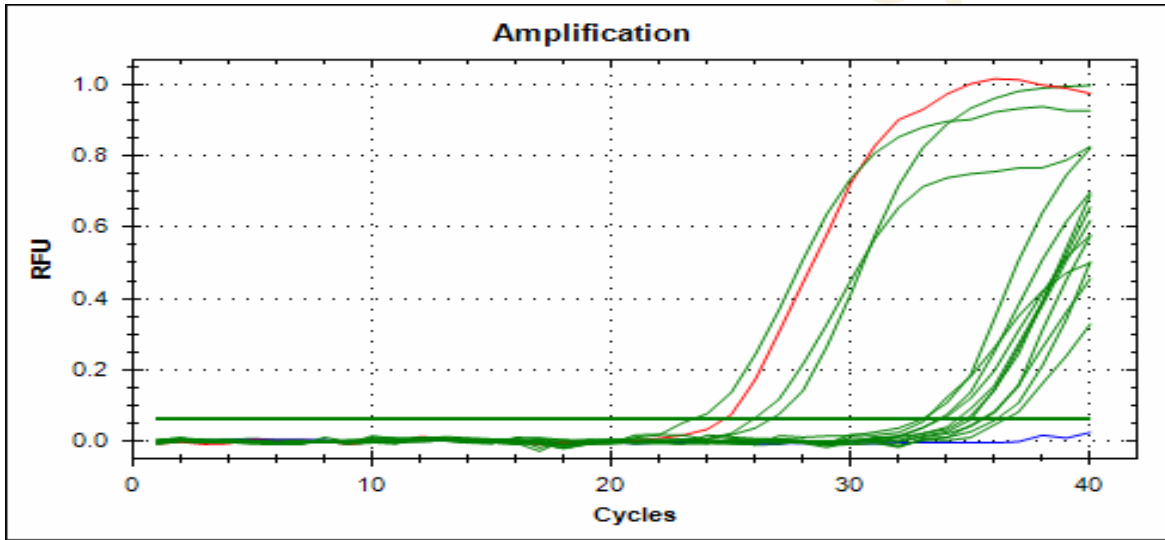
X² الجدولية = 1.21
 * توجد فروق معنوية عند مستوى احتمالية P ≤ 0.05 .

نسبة الإصابة بطفيلي *G.lambli* تبعاً لموقع السكن بأستعمال تقنية Real-Time PCR
 بينت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود فروق معنوية في نسب الإصابة عند مستوى احتمالية P ≤ 0.05 حيث كانت أعلى نسبة للإصابة في المناطق الريفية إذ بلغت 75.86% وأقل نسبة للإصابة في مناطق المدينة والتي بلغت 69.56% كما في الجدول (10).

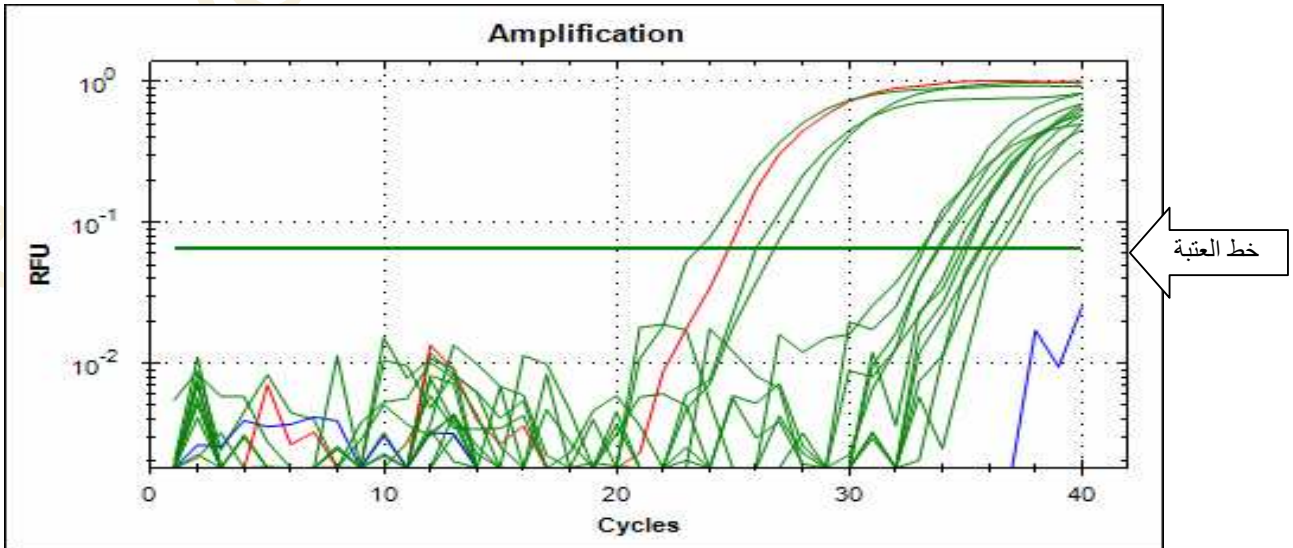
الجدول (9) نسبة الإصابة بطفيلي *G. lambli* تبعاً لمناطق السكن بأستعمال تقنية Real-Time PCR

موقع السكن	العدد المفحوص	عدد المصابين	النسبة المئوية للإصابة (%)
ريف	29	22	75.86
مدينة	23	16	69.56
المجموع	52	38	73.07

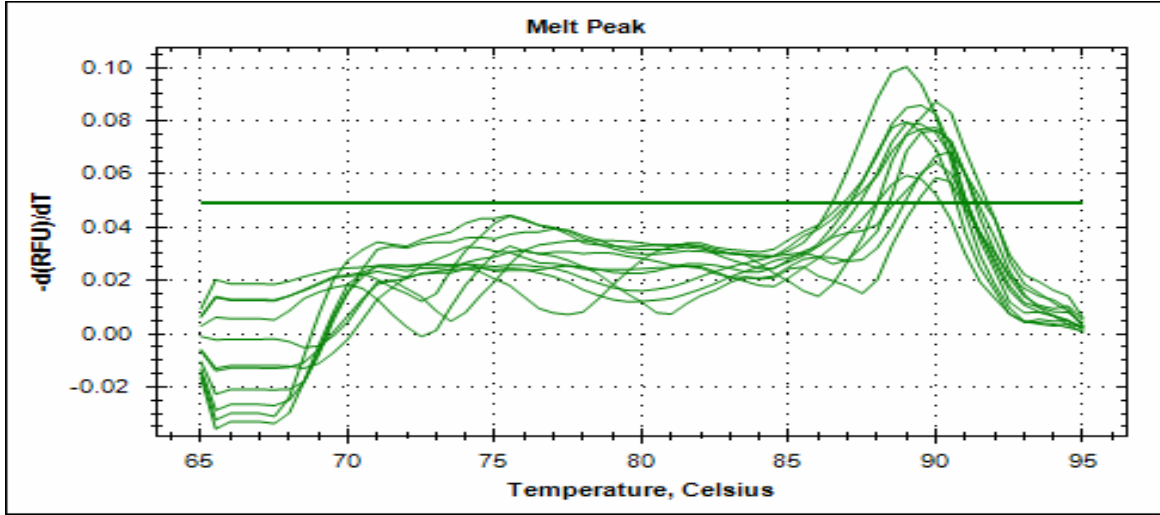
X² المحسوبة = 0.096
 X² الجدولية = 0.756
 * لا توجد فروق معنوية عند مستوى احتمالية P ≤ 0.05 .



الشكل (2): منحنى التضخم Amplification plot لفحص Real-Time PCR العينات الموجبة لتشخيص طفيلي *G. lambli*



الشكل (3): منحنى التضخم اللوغارتمي Amplification log plot لفحص Real-Time PCR العينات الموجبة لتشخيص طفيلي *G. lamblia*



الشكل (4): درجة الانصهار لخصوصية فحص Real-Time PCR العينات الموجبة لتشخيص طفيلي *G. lamblia*

المناقشة

نسبة الإصابة الكلية بطفيلي *G. lamblia* بواسطة الفحص المجهرى بالمسحة المباشرة الرطبة وطريقة التطويق سجلت الدراسة الحالية نسبة إصابة بطفيلي *G. lamblia* بلغت 5.61% من مجموع 926 عينة غائط فحصت مجهرياً بالمسحة المباشرة الرطبة وطريقة التطويق، وهي نسبة مشابهة تقريباً للعديد من الدراسات منها ما سجله (9) في محافظة بابل إذ سجل نسبة إصابة بلغت 5.4% في الأطفال الرضع من فحص 315 عينة غائط، ولما سجلته (10) في مدينة الناصرية حيث سجل نسبة إصابة 4.8% عند فحص 500 عينة غائط من ناحية البطحاء والغراف، ولما سجله (11) في محافظة صلاح الدين إذ سجل نسبة إصابة بلغت 5.20% من فحص 1500 عينة غائط في مستشفى قضاء الطوز.

في حين سجلت هذه الدراسة نسبة إصابة أقل مما سجلته (12) إذ سجلت نسبة إصابة بلغت 16.13% في محافظة الديوانية، و(13) في مدينة بابل حيث سجلت نسبة إصابة 13.16%، ولما سجلته (14) في محافظة النجف الأشرف حيث سجل نسبة إصابة 14.8% عند فحص 3383 عينة غائط.

بينما سجلت هذه الدراسة نسبة إصابة أكثر مما سجله (15) في محافظة بغداد إذ سجل نسبة إصابة كلية 3.78% في الأطفال، ولما سجله (16) في بغداد في مستشفى الكاظمية إذ سجل نسبة إصابة 1.77% عند فحص 1520 عينة غائط لأطفال تراوحت أعمارهم من شهر واحد -12 سنة.

أن الأختلاف في نسبة الإصابة المسجلة في الدراسة الحالية إلى الدراسات المذكورة أعلاه ربما يعود إلى الأختلاف في مستوى الصرف الصحي والنظافة الشخصية، والكثافة السكانية، والموقع الجغرافي، والظروف المناخية، والعدد الكلي من العينات المفحوصة، وطرق الفحص، ومدى دقة ومهارة الفاحص وتقنيات الفحص، ومدة الدراسة، والفئات العمرية لعينة الدراسة.

علاقة النسبة المنوية للإصابة بطفيلي *G. lamblia* بالجنس باستعمال الفحص المجهرى

سجلت الدراسة الحالية نسبة إصابة في الذكور 6.12% أعلى من الإناث 5.11%، وهي متفقة تبعاً للجنس وليس القيمة مع ما سجله (11) في صلاح الدين حيث سجل نسبة إصابة في الذكور 6.94% وفي الإناث 3.13%، ومع (14) في النجف الأشرف حيث سجل نسبة إصابة في الذكور 16.8% وفي الإناث 11.1%، في حين أشار (17) في كربلاء، و(18) في الديوانية إلى عدم وجود فروق معنوية بين الجنسين. الأختلاف في نسبة الإصابة بين الذكور والإناث ربما يعود إلى حقيقة كون الذكور هم الفئة الأكثر حركة وتماسكاً مع عوامل البيئة الخارجية أثناء اللعب ويكونهم الفئة العاملة في المجتمع، فهذا الأمر يجعلهم أكثر اتصالاً بالمسببات المرضية من الإناث، حيث يأكلون ويشربون أيضاً في الأماكن العامة أو من الباعة المتجولين وهذا يزيد فرص التعرض للإصابة.

علاقة النسبة المنوية للإصابة بطفيلي *G. lamblia* بالعمر باستعمال الفحص المجهرى

سجلت الدراسة الحالية أعلى نسبة إصابة 13.87% في الفئة العمرية 2-4 سنوات، وهي متفقة مع ما سجله (19) في ذي قار حيث سجل أعلى نسبة إصابة 33.3% في الفئة العمرية 24-48 شهر، ومع ما سجله (16) في بغداد حيث سجل أعلى نسبة إصابة 2.75% في

الفئة العمرية 2-4 سنوات. ولم تتفق مع ما سجلته (14) حيث سجلت أعلى نسبة إصابة في الأطفال أقل من سنة وبنسبة 28.0%. قد يعود ارتفاع نسبة الإصابة في الفئة العمرية 2-4 سنوات قيد الدراسة إلى حقيقة كون الأطفال في هذا العمر أكثر حركة ونشاطاً وقلة الوعي لديهم بقواعد النظافة كغسل اليدين قبل الأكل وبعد استخدام التواليت، وممارسة عادة وضع الأصابع في الفم خصوصاً في الأطفال حاملي الأكياس، وكونهم في هذا العمر مثلهم لأجل تذوق أي شيء هذا ربما يزيد نسبة الإصابة في هذه الفئة العمرية. ويؤكد (20) إلى أن انتشار الإصابة بالطفيليات في العالم يعتمد على عدة عوامل منها النظافة الشخصية والعامة والمستوى الاجتماعي والاقتصادي وعوامل بيئية أخرى.

علاقة النسبة المنوية للإصابة بطفيلي *G.lamblia* بمنطقة السكن باستعمال الفحص المجهرى

سجلت الدراسة الحالية أعلى نسبة للإصابة بين سكان المناطق الريفية إذ بلغت 7.07% أقل نسبة من الإصابة بين سكان المناطق الحضرية وبنسبة 4.45%، وهي متفقة مع مسجله (21) في الديوانية حيث سجل أعلى نسبة للإصابة بطفيلي الجيارديا في سومر والحزمة بنسبة إصابة 16.1% و 15.3% على التوالي، كما سجلت (18) في الديوانية أيضاً أعلى نسبة للإصابة في الريف بنسبة 18.65% وهي أعلى من الإصابة في المناطق الحضرية والتي بلغت 10.11%.

أن سبب ارتفاع الإصابة في الريف يعود لعدة عوامل منها عدم توافر مياه شرب نقية والاعتماد على مياه النهر كمصدر مباشر للمياه فضلاً عن انخفاض المستوى الصحي والثقافي لسكان الريف، وتربية الحيوانات الخازنة للطفيلي والتماس معها، واستخدام الفضلات الحيوانية وأحياناً البشرية كسماد عضوي، هذا ما أكدته (22) في باكستان حيث وجد أن خطر الإصابة بالجيارديا يزداد بين عوائل الفلاحين اللذين يستعملون مياه الصرف الصحي (المياه الثقيلة) لري المزروعات وبنسبة إصابة 77.4% بالمقارنة مع عوائل الفلاحين اللذين يستعملون المياه النظامية لري مزروعاتهم وبنسبة إصابة 49.2%.

علاقة النسبة المنوية للإصابة بطفيلي *G.lamblia* بأشهر السنة باستعمال الفحص المجهرى

لوحظ من خلال نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة للإصابة كانت في شهري حزيران و أيار بنسبة 10.37% و 8.63% على التوالي وهي متفقة مع (17) إذ سجل في شهري حزيران و أيار نسبة 10.95% و 6.83% على التوالي، و أقل نسبة للإصابة كانت في شهر كانون الثاني بنسبة 1.92% وهي تتفق مع (23) إذ سجل أدنى نسبة للإصابة في شهر كانون الثاني بنسبة 1.52%. ارتفاع نسب الإصابة بالطفيلي في أشهر الصيف ربما يعود إلى توافر الظروف الملائمة لنمو الطفيلي وتواجد الحشرات الناقلة كالذباب والصراصير والبعوض التي تعد ناقلاً ميكانيكياً لأكياس الطفيلي وفي الصيف زيادة في شرب الماء والعصائر والمربطات واستعمال الثلج المصنوع من مياه غير معقمة.

نسبة الإصابة الكلية بطفيلي *G.lamblia* باستعمال تقنية Real-Time PCR

أجريت عملية استخلاص DNA لـ 52 عينة غائط موجبة لطفيلي الجيارديا بالفحص المجهرى وكانت 38 عينة منها حاوية على المادة الوراثية للطفيلي وبنسبة 73.07% وهي نسبة مقارنة لدراسة (24) في البرتغال من 30 عينة موجبة لطفيلي الجيارديا ظهرت 29 عينة حاوية على جين *tpi* و *B-giardin* بنسبة 97%، و 26 عينة حاوية على جين *gdh* بنسبة 87%، و 21 عينة حاوية على جين *orfC4* وبنسبة 70% ونسبة الدراسة الحالية أعلى مما سجله (25) في مصر من مجموع 97 عينة غائط 41 عينة فقط حاوية على جين *tpi* وبنسبة 42.3% الاختلاف في نتائج تقنية Real-Time PCR ربما يعود إلى الاختلاف في طرق استخلاص DNA من عينات الغائط وطرق عمل Real-Time PCR، وربما بسبب الاختلاف في كمية الطفيليات الموجودة في الغائط بعض العينات كانت موجبة بالفحص المجهرى لكنها كانت سالبة في تقنية Real-Time PCR ربما يعزى ذلك إلى عدة أسباب يأتي في مقدمتها خطأ في التشخيص المجهرى لبعض العينات أو وجود مواد مثبطة في بعض عينات الغائط ربما ترتبط بآيزيم البلمرة DNA Polymerase فتتبط عمله وتمنع حصول عملية تضخيم DNA أو قد يكون بسبب الوقت بين أخذ العينات وتحليلها فالعديد من العينات المستخلص منها DNA والمستعمل في تقنية Real-time PCR مأخوذ من غائط مخزن لمدة طويلة وبدرجات حرارية مرتفعة مما يؤدي ذلك إلى تحلل هذه العينات وإعطاء نتائج سالبة خاطئة (26).

علاقة النسبة المنوية للإصابة بطفيلي *G.lamblia* بالجنس باستعمال تقنية Real-Time PCR

بينت نتائج الدراسة الحالية إلى أن الإصابة في الذكور أعلى من الإناث بنسبة 75% و 70.83% على التوالي إلا أنه لا توجد فروق معنوية لجنس الطفل على الإصابة بالجيارديا باستعمال تقنية Real-Time PCR وهذا يتفق مع ما توصل إليه (27) الذي وجد من بين 70 عينة موجبة بفحص PCR 41 ذكر مصاب وبنسبة 58.57% و 29 أنثى مصابة 41.42%.

علاقة النسبة المنوية للإصابة بطفيلي *G.lamblia* بالفئة العمرية باستعمال تقنية Real-Time PCR

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية لعمر الطفل على الإصابة بالجيارديا باستعمال تقنية Real-Time PCR حيث سجلت الفئة العمرية 2-4 سنوات أعلى نسبة للإصابة وهذا لا يتفق مع (14) الذي سجل الفئة العمرية أقل من سنة هي الأعلى نسبة للإصابة والتي بلغت 85.7% وكذلك لا يتفق مع (28) الذي وجد الفئة العمرية 4-5 سنوات هي الأعلى نسبة للإصابة بالجيارديا بفحص PCR وبنسبة 72.8%.

علاقة النسبة المنوية للإصابة بطفيلي *G.lamblia* بمنطقة السكن باستعمال تقنية Real-Time PCR

بينت نتائج الدراسة الحالية إلى أن نسبة الإصابة في المناطق الريفية أعلى من الإصابة في المناطق الحضرية بنسبة 75.86% و 69.56% على التوالي إلا أنه لم تظهر فروق معنوية بينهما وهذه النتائج تختلف عن (14) التي وجدت فروقاً معنوياً للإصابة بين الريف والمدينة بنسبة 45.5% و 32.4% على التوالي.

المصادر

- 1- **Molina, N.; Polverino, D.; Minvielle, M. and Basualdo, J. (2007).** PCR amplification of triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin –fixed feces. J. Microbiologia.;49(1-2):6-11.
- 2- **Savioli, L.; Smith, H. and Thompson, A. (2006).** *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Diseases Initiative" Trends in Parasitology.; 22(5) :203-208.
- 3- **Wilhelm, J. and Pingoud, A. (2003).** Real-time polymerase chain reaction. Chem. Bio. Chem.;4(11):1120–1128.
- 4- **Arya, M.; Shergill, I.S.; Williamson, M.; Gommersall, L.; Arya, N. and Patel, H.R. (2005).** Basic Principles of real-time quantitative PCR. Expert Rev. Mol. Diagn.;5(2):1-11.
- 5- **الحديثي، إسماعيل عبد الوهاب و عواد، عبد الحسين حبش. (2000).** علم الطفيليات . الطبعة الثانية ، مطبعة جامعة البصرة :485 صفحة.
- 6- **Verweij J.J.; Schinkel, J.; Laeijendecker, D.; van Rooyen, M.A.; van Lieshout, L. and Polderman, A.M. (2003).** Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. Mol. Cell. Probes.;17(5): 223–225.
- 7- **Melzak, K.A.; Sherwood, C.S.; Turner, R.F. and Haynes, C.A. (1996).** Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. J. Colloid and interface Sci. ;181(2):635-644.
- 8- **الراوي، خاشع محمود (2000).** المدخل إلى الإحصاء. دار الكتب للطباعة و النشر، جامعة الموصل، الموصل، العراق، الطبعة الثانية : 469 صفحة.
- 9- **Al-Marzoqi, A.H.M. (2004).** Incidence of rotavirus and other enteropathogens causing acute diarrhea in Hilla infants. M. Sc. Thesis, Coll. Med., Univ. Babylon: 114 pp.
- 10- **العبدوي، بسعاد عقرب معلقة (2010) وبانية الأوالي المعوية *Giardia lamblia* و *Entamoeba histolytica*** بين مراجعي المراكز الصحية في ناحيتي الغراف والبطحاء التابعة لمحافظة ذي قار. مجلة علوم ذي قار، 2(2): 59-64.
- 11- **الجبوري، عبد الله حسين عبد الله، التكريتي، الهام عائد اسعد و البياتي، شجاعان رضا حسن (2012)** دراسة وبائية عن الأوالي المعوية في قضاء الطوز مع دراسة التأثير النسيجي الممرض على أمعاء الفئران المصابة بالجيارديا. مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 17(3): 108-115.

- 12- المياحي، عاصفة مطرود ياسين.(2004).دراسة وبائية لنوعين من الطفيليات المعوية الممرضة *Entamoeba histolytica* و *Giardia.lamblia* بين سكان مدينة الديوانية. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة القادسية: 61 صفحة .
- 13- الموسوي، حوراء صباح مهدي.(2012). دراسة وبائية لطفيلي *Giardia.lamblia* في محافظة بابل واختبار فعالية المستخلص المائي البارد والمسحوق الخام لقشور ثمار الرمان في معالجة القطط والجرذان المصابة تجريبياً بالطفيلي . رسالة ماجستير ،كلية العلوم للبنات، جامعة بابل :125 صفحة .
- 14- المحنة ،وداد هاشم يحيى.(2013).دراسة وبائية وتشخيصية لأنماط الوراثة لطفيلي *Giardia.lamblia* المسبب للإسهال لدى المرضى في محافظة النجف الاشرف بتقنية PCR. رسالة ماجستير ، كلية التربية بنات، جامعة الكوفة :103 صفحة .
- 15- حسين ، عبد الوهاب بديوي (2009) . دراسة انتشار الطفيليات المعوية في المرضى المراجعين لبعض مستشفيات بغداد .مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة ،3(2) :1-11.
- 16- Ibrahim,A.Q.(2012).Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* in Children in Kadhmiah Hospital.The Iraqi.J.Med.;36(1):32-36.
- 17- الكبسي، علي حسين مكي، رمضان، محمد، سجاد، قيصر عبد، مهدي، علاء حسين، عبد المجيد، محمد نوفل والرشيدي، كاظم احمد علي (2007). مسح الطفيليات المعوية الابتدائية والمسببة للإسهال في قضاء الهندية/كربلاء.مجلة جامعة كربلاء العلمية ، 5(4):6-10.
- 18- الفتلي،ظفر رشيد حميد.(2008). دراسة وبائية لداء الجيارديات في بعض الحيوانات الحقلية والإنسان في محافظة الديوانية.رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة القادسية: 90 صفحة .
- 19-Hussein, T. K. (2010). Prevalence and related risk factors for *Giardia lamblia* infection among children with acute diarrhea in Thi-Qar, southern Iraq.Thi-Qar Medical J.; 4(4): 68-74.
- 20-Horge,M.A.;Naparst,T.R. and Nissen,M.D.(2006) Amoebiasis. Medicine Med.Lib.web site.
- 21- الميالي، هادي مدلول حمزة (2000). دراسة نسبة انتشار الإصابة بالطفيليات المعوية في محافظة القادسية .مجلة القادسية ،5(1) :92-103.
- 22- Ensink, J. H.; Hoek, W. V. and Amerasinghe, F. P. (2006). *Giardia duodenalis* infection and WasteWater irrigation in Pakistan .Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.; 100(6): 538-542.
- 23- الجبوري، ضمياء إبراهيم علوان (2010). دراسة وبائية الطفيليات المعوية المسببة للإسهال في المركز الصحي لناحية جديدة الشط في محافظة ديالى. مجلة جامعة كربلاء العلمية، 8(1):180-186.
- 24- Almeida, A. ; Pozio,E. and Caccio, S .M. (2010). Genotyping of *Giardia duodenalis*

cysts by new Real-Time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. ,Ame.Soci. Mic.; 76(6):1895-1901.

- 25- **Helmy,M.M.; Abdel-Fattah,H.S. and Rashed, L.(2009)**. Real -Time PCR/ RFLP assay to detect *Giardia intestinalis* genotypes in human isolates with diarrhea in Egypt.J.Parasitol.;95(4):1-5.
- 26- **Furrows , S. J.; Moody , A. H. and Chiodini , P. L. (2004)**. Comparison of PCR and Antigen detection methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection . J. Clin. Pathol.; 57(12) : 1264 – 1266 .
- 27-**Molina,N.;Pezzani,B.;Ciarmela ,M.;Orden,A.;Rosa,D. ;Apezteguia,M.;Basualdo,J. and Minvielle,M.(2011)**.Intestinal parasites and genotypes of *Giardia intestinalis* in school children from Berisso Argentina.J. Infect. Dev. Ctries.;5(7):527-534.
- 28- **Ignatius, R. ; Gahutu, J. B. ; Klotz, C.; Steininger, C. ; Shyirambere, C. ; Lyng, M. ; Musemakweri ,A . ; Aebischer , T.; Martus , P. and Harms , G. (2012)** . High Prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B Infection and Association with Underweight in Rwandan Children. J. Plos. Negl. Trop. Dis.;6(6): 1-9.

Molecular Diagnosis of *Giardia* intestinal parasite for children with diarrhea by using Real-Time PCR technique

Hadi Madlul Hamza Al-Mayali , Lubna Abdul-Kader Al-Ibrahimi
[Lubna a k@yahoo.com](mailto:Lubna_a_k@yahoo.com)

Department of Biology / College of Education / University of Al-Qadisiya

Abstract

The current study was conducted during the period from 1/11/2012 to 30/06/2013 to investigate the rate of the parasite *Giardia* in children with diarrhea for age groups ($\leq 1 - 12$ years) exclusively in AL-Diwaniyah city by using microscopic examination and interaction

of polymerase chain Real-Time PCR. The results of the study showed that the total rate infection of parasite *Giardia* was 5.61 % (52 sample of 926 samples) , The direct smear method and floatation method. The results examination microscopic of samples showed the rate of infection among males 6.12 % was higher than in females 5.11 % , the higher infection rate 13.87 % in the age group 2-4 years and the lowest rate in the age group 8-10 years and reached to 1.52 % .the highest rate of infection in June 10.37 % and the lower rate in January 1.92 % . the higher infection rate among rural residents was 7.07 % comparing with the urban residents which reached to 4.45 % . the statistical analysis results showed significant differences at $P < 0.05$.

The extraction results of DNA of 52 positive samples by microscopic examination showed containing 38 sample on the genetic material of the parasite with rate of 73.07 % , statistical analysis of survey results depending on technology of Real-Time PCR showed a significant differences in the infection between the age groups where age group 2-4 years recorded the higher rate of Infection 83.33 % while statistical analysis results did not show significant differences of Infection according to sex which reached to 75% in the males and 70.83 % in females , Also did not show significant differences according to the areas of housing which reached to 75.86 % in rural areas comparing with the urban areas , which reached to 69.56 % The current study showed the existence of a close relationship between cases of diarrhea and parasite *Giardia lamblia* infection.

The Research is apart of on MSC. Thesis in the case of the second researcher .