Journal of Kufa for Nursing Science Vol. (3) No.(2) 2013

Adiagnostic Study Of The Giardia Lamblia Parasite Genotypes, Which Causes Diarrhea Among The Patients In Najaf, Province, By Using The PCR Technique

دراسة تشخيصية للأنـماط الوراثية لطفيلي *Giardia lamblia* المسبب للإسهال لدى المرضى في محافظة النجف بأستخدام تقنية الـ PCR

***Widad Hashim Yahya**
****Dr. Jameel Jerri Yousif**

Abstract

Objective: It aims to study the prevalence of the *Giardia lamblia* parasite and identify genotypes of the parasite in patients with diarrhea in the province of Najaf by using the microscopic examination and the polymerase chain reaction(PCR).

Methodology: The Present study was carried out in the Department of Biology - College of Education for Girls - University of Kufa for the period from July 2011 until June 2012. The number of collected samples (100) stool samples from hospitals of Najaf province (Al-Sadr teaching hospital, Al-Hakim general hospital,Al-Zahra for childbirth and children hospital, Manathira general hospital and Al- Sajad general hospital) .The statistical analysis , by using t-test and ANOVA anad calculate the less significant diffirence (L.S.D) at the level 0.05.

Results: The results of the extraction (100) Stool Samples by microscopic examination , presence of the gentic material DNA of the *G. lamblia* Parasite in (41) Samples and by 41% , and results of the examination by PCR by using Triose phosphate isomerase (*Tpi*) Showed that there are significant differences at the level of probability, $p < 0.05$. where the highest percentage infection with the genotype (B) compared with the genotype (A), were 61% and 39.1% respectively. The highest rate of infection with the genotype (B) in the semi-liquid samples was 69.3% compared to of liquid samples, which amounted to 67.9%, while the genotype (A) has the highest rate of infection in the liquid samples, which amounted to 32.2% while it was 30.8% in the semi -liquid samples . As the results showed that the percentage of infected male with the genotype (B) is more than it in females, reaching 62.5% and 58.9%, respectively, and type (A) was incidence of females was higher than in males, 41.2% and 37.5% respectively. As the results show the spread of genotype (B) in the urban area is more than it in the rural, the percentage of infection is,72.8% and 66.7% respectively, while type (A)was more prevalent in rural than in the urban, where the percentage of infection is 33.4% and 27.3% respectively.

Conclusion: The highest rate of infection with the genotype (B) in the semi-liquid samples compared to of liquid samples, while the genotype (A) has the highest rate of infection in the liquid samples, compared the semi -liquid samples .

Recommendation: Further study the relationship between the symptoms and the genotypes of *Giardia lamblia*.

الخلاصة

الهدف: تهدف الدراسة الحالية تحديد الأنماط الوراثية لطفيلي ***Giardia lamblia*** لدى المرضى المصابين بالإسهال في محافظة النجف بتقنية تفاعل السلسلة المتبلمرة (PCR). **المنهجية** أجريت الدراسة الحالية في قسم علوم الحياة ـ كلية التربية للبنات ـ جامعة الكوفة للفترة من تموز 2011 ولغاية حزيران 2012 وكان عدد العينات التي جمعت (100) عينة براز من مستشفيات محافظة النجف (مستشفى الصدر التعليمي ، مستشفى الحكيم العام ، مستشفى الزهراء للولادة والأطفال ، مستشفى المناذرة العام ، مستشفى السجاد) وكان التحليل الإحصائي المستخدم اختبار t-test و ANOVA واستخراج أقل فرق معنوي (L.S.D) عند مستوى أحتمال 0.05. **النتائج** بينت نتائج استخلاص (100) عينة براز للمرضى التي أظهرها الفحص ألمجهري وجود طفيلي *G. lamblia* فيها الى احتواء (41) عينة منها على المادة الوراثية DNA للطفيلي وبنسبة 41 % وأوضحت نتائج فحص الـ PCR التي حللت إحصائيا أن هنالك فروقات معنوية عند مستوى احتمال P< 0.05.حيث أن أعلى نسبة إصابة بالنمط الوراثي (B) مقارنة بالنمط الوراثي (A) التي بلغت 61% و 39.1% على التوالي .وكانت أعلى نسبة للإصابة بالنمط (B) في العينات شبه السائلة أذ كانت 69.3% مقارنة بالعينات السائلة التي بلغت 67.9 % ، أما النمط الوراثي (A) فقد كانت أعلى نسبة للإصابة في العينات السائلة التي بلغت 32.2% في حين كانت في العينات شبه السائلة 30.8% . كما وبينت النتائج أن نسبة إصابة الذكور بالنمط الوراثي B هي أكثر مما هو عليه في الإناث أذ بلغت 62.5% و 58.9% على التوالي أما النمط A فقد كانت نسبة إصابة الإناث أعلى مما هو عليه في الذكور حيث كانت 41.2% و 37.5% على التوالي . كما وأظهرت النتائج انتشار النمط الوراثي (B) في المدينة أكثر مما هو عليه في الريف فقد بلغت نسبة الإصابة 72.8% و 66.7% على التوالي ، بينما النمط الوراثي (A) كان أكثر انتشارا في الريف مما هو في المدينة حيث بلغت نسبة الإصابة 33.4% و 27.3% على التوالي.**الاستنتاجات** :. كانت أعلى نسبة للإصابة بالنمط (B) في العينات شبه السائلة مقارنة بالعينات السائلة، أما النمط الوراثي (A) فقد كانت أعلى نسبة للإصابة في العينات السائلة مقارنة في العينات شبه السائلة **.التوصيات** : أجراء دراسة مستقبلية عن العلاقة بين أعراض مرض الجيارديا والأنماط الوراثية لطفيلي *G.lamblia* .

Keyword: Giardia, Genotype Polymerase, Diagnostic, Technique

***MSc.in Parasitology/ College of Education for Girls/ University of Kufa**
Assist. prof. in Parasitology College of Education for Girls/ University of Kufa

المقدمــة

يعد داء الجياردیــات Giardiasis الذي يسببه طفيــلي *Giardia lamblia* العائد إلى الاوالــي المسوطة من الإمراض المهمة الذي يصــاب به أكــثر من 200 مليون شخــص سنويا في البلدان النــامية (Yason and Rivera , 2007). ويصيب عادة منطقة ألاثني عشري والجزء الأعلى من الامعاء الدقيقة في الإنسان وبعض الحيوانات مثل الأغنام ،الأبقار، الماعز،الطيور، الخيول ،والكلاب (Thompson *et al* .,2004).
يعد طفيلي *Giardia lamblia* من المسببات المرضية المشتركة بين الإنسان والحيوان Zoonotic agent (Yoder *et al* .,2010; Thompson *et al*., 2008). وتحدث الاصابة بالمرض عادة بالتهام الأكياس الناضجة مع الطعام والشراب (Sannella *et al*., 2002) ، وممكن أن تنتقل الاصابة من شخص إلى أخر عن طريق التماس الفموي – ألبرازي Oral – fecal contact الذي يعتبر احد أسباب الانتشار الواسع لهذا الطفيلي (Karanis *et al*., 2011).أما أهم الأعراض التي يمكن ملاحظتها على الشخص المصاب تشمل الإسهال ذو الرائحة الكريهة والذي يكون دهنيا Steatorrhoea وانتفاخ البطن Flatulence وفقدان الشهية Anorexia والغثيان Nausea (Hill *et al*., 2001).

لقد استعملت التقنيات الجزيئية الحديثة كتقنية الـ PCR في تشخيص جينات بعض الأنزيمات العائدة لطفيلي الجيارديا لامبليا مثل B-giardin و Glutamate dehydrogenase (Gdh) و Triosphosphate (Tpi) isomerase المعزولة من البراز وذلك لدراسة العلاقة بين الأنماط الجينية Genotype المختلفة حيث وجد من خلال الدراسات أن الحيوانات الحقلية والبرية تصاب بحوالي 5-7 من الأنماط الوراثية والتي تعد مصدرا لإصابة الانسان (Caccio *et al* .,2005 ; Van- Kenlen *et al* ., 2002) استخدم جين الـ Tpi بنجاح في تشخيص الأنماط الوراثية لطفيلي *G. lamblia* المعزولة من الإنسان (Leonhard *et al* .,2007; Amar *et al*., 2002). تعد تقنية الـ PCR ذات حساسية وخصوصية عالية في الكشف عن الأعداد المنخفضة للطفيلي في عينات البراز مقارنة بالطرق التقليدية كطريقة الفحص المباشر باستخدام المجهر الضوئي التي تعتمد على الشكل الظاهري في تشخيص الطفيلي ولا تعكس الصورة الحقيقة للتغاير الوراثي الموجود ضمن الأنواع المختلفة في الجيارديا (Mcglade *et al*., 2003 ; Bialek *et al*., 2002) . وفي العقود الأخيرة ، يعد التصنيف الجزيئي كوسيلة لتشخيص هذا الطفيلي الابتدائي وكذلك لفهم أمراضيته وتوزيعه بين مضائفه (Minivielle *et al*., 2008) لقد أثبت تحليل الـ DNA أن جنس الجيارديا يحوي أنواع متعددة معقدة التشخيص المظهري ولكنها مختلفة كليا بعضها عن بعض في تنوعها الجيني (Molina *et al*., 2007).ونظرا للمتغيرات البيئية والصحية والخدمية التي تشهدها محافظة النجف الاشرف ولزيادة عدد المراجعين المصابين بالإسهال للمستشفيات والعيادات الشعبية في المحافظة ولندرة الدراسات على المستوى الجزيئي اقترحت الدراسة الحالية والتي تهدف الى تحديد الانماط الوراثية لطفيلي *G .Lamblia* التي تصيب الانسان بأستخدام تقنية تفاعل السلسلة المتبلمرة PCR **أهداف البحث:** تحديد الأنماط الوراثية لطفيلي *G.lamblia* التي تصيب الإنسان باستعمال تقنية الـPCR

المواد وطرق العمل :

1- المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي

1- محلول صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide Solution

حضر بإذابة 0.05 غرام من صبغة بروميد الاثيديوم في 10 ملي لتر من الماء المقطر المعقم للحصول على تركيز نهائي 5 ملغم وحفظ في قنينة معتمة ، (Pospiech and Neuman,1995).

2- محلول Tris- Borat EDTA (TBE)

يتكون المحلول من 0.089 مولار من Tris –OH ، و0.089 مولار من حامض اليوريك و0.002 مولار من Na2 – EDTA في 800 ملي لتر من الماء المقطر، وعدل الأس الهيدروجيني إلى 8 ،وأكمل الحجم إلى 1000 ملي لتر، وعقم بالموصدة ،وحفظ بدرجة 4 م لحين الاستعمال (Sambrook *et al*.,1989).

3- محلول التحميل Loading Buffer

حضر المحلول بإذابة 0.25 غرام من صبغة البروموفينول الازرق و4 غرام من السكروز في 10 ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر، وحفظ بدرجة 4 م Sambrook *et al* ., 1989) .

2- جمع عينات البراز Sample collection

جمعت (100) عينة من عينات البراز من المرضى الذين يعانون من الاسهال المراجعين الى مستشفيات محافظة النجف الاشرف (مستشفى الصدر التعليمي ، مستشفى الحكيم العام ، مستشفى الزهراء للولادة والاطفال ، مستشفى المناذرة العام ، مستشفى السجاد) للفترة من تموز 2011 ولغاية حزيران 2012 تم التأكد من من أصابتها بطفيلي *G.lamblia* عن طريق فحصها مجهريا في مختبر الطفيليات الخاص بكل مستشفى وحفظت العينات بدرجة حرارة (-20م) لحين أستخدامها في فحوصات الـ PCR :

3-استخلاص الحامض النووي DNA Extraction

أستخلصت المادة الوراثية DNA من عينات براز المرضى وذلك بأستخدام (Stool DNA Extraction Kit (Bioneer- Korea) وحسب تعليمات الشركة المصنعة واعتمادا على (Melzak,1996).

4 - البادئات Primer : استخدمت البادئات المذكورة في جدول (1) والمجهزة من شركة Bioneer-Korea لغرض التحري عن جين (Tpi) الخاص بالانماط الوراثية A , B لطفيلي *G. lamblia*.

الجدول(1) :- البادئات المستخدمة في الدراسة مع تسلسلها النيوكلوتيدي وناتج فحص إلـ PCR

primer	Gene name	Primer Sequence(5' –'3)	PCR product
Genotype A	*Tpi-F*	CGAGACAAGTGTTGAGATG	576 bp
	Tpi-R	GGTCAAGAGCTTACAACACG	
Genotype B	*Tpi-F*	GTTGCTCCCTCCTTTGTGC	208 bp
	Tpi-R	CTCTGCTCATTGGTCTCGC	

5 - تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix.

حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام عدة ألـ Accupower PCR Premix وحسب تعليمات الشركة وكالاتي :-

1- يتم تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة المبين في جدول (2) أنابيب ألـ PCR المجهزة مع العدة الحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة وأضيفت المكونات الأخرى لمزيج التفاعل .

2– بعد أكمال تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة تم غلق الأنابيب ومزجت بعناية بجهاز المازج vortex لمدة (5) ثواني .

3– نقلت الأنابيب لجهاز إلـ PCR Thermo cycler لأجراء حالات الدورات الحرارية PCR thermo cycler condition .

الجدول (2): مزيج سلسلة تفاعل أنزيم البلمرة حجم 20 مايكروليتر

الحجم	**المكونات**
5 µl	Master mix
5 µl	DNA template
1.5 µl	Forward primer (F)
1.5 µl	Reveres primer(R)
7 µl	Nuclease free water
20 µl	total

6 - برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـDNA .

تم اجراء عملية التضخيم حسب الظروف المبينة في الجدول التالي

الجدول (3) : ظروف التفاعلات المستخدمة في جهاز الدورات الحرارية:

الخطوات	درجة الحرارة	الوقت	عدد الدورات
Initial Denaturtion	94 C	5min	1
Denaturetion	94 C	30 sec	
Anneling	55C	30 sec	
Extension	72C	30 sec	35
Final Extesion	72C	5min	1

7- الترحيل الكهربائي بالهلام Agarose gel Electrophoresis

تم أجراء الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بنسبة 1.5% وذلك بقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR Product analysis وحسب طريقة (Balamurugan *et al*., (2009 .

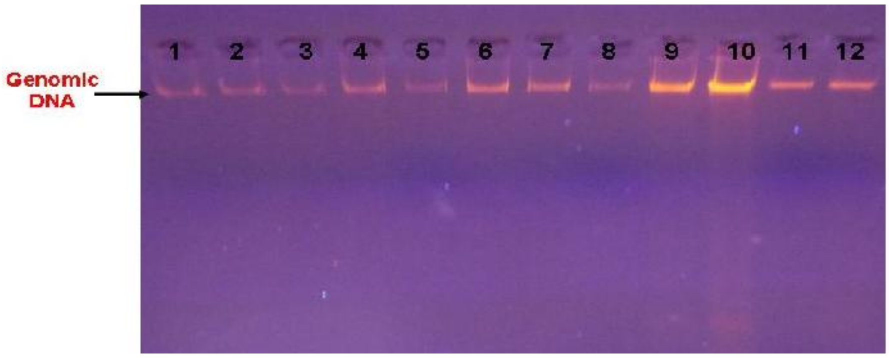
التحليل الإحصائي Statistical Analysis .

حللت النتائج إحصائيا بأستخدام أختبار T-test وتحليل التباين ANOVA وأستخراج أقل فرق معنوي (L.S.D) عند مستوى أحتمال 0.05 ، (الراوي، 2000).

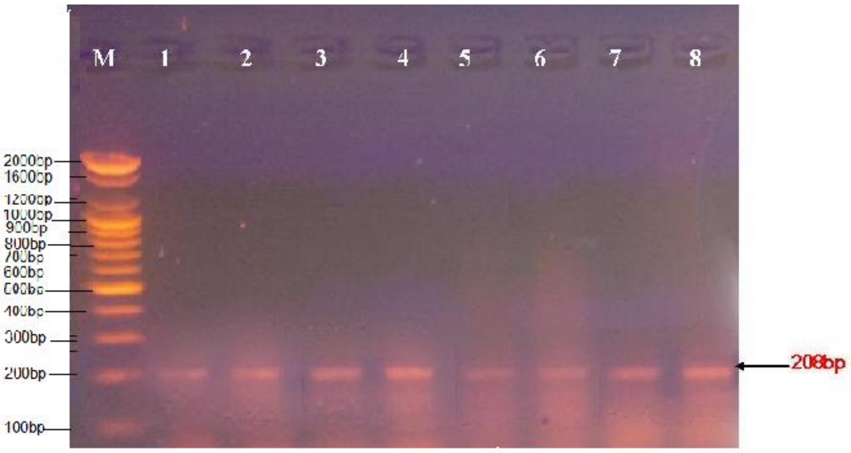
النتائج:

نواتج استخلاص الـ DNA والنسبة الكلية للاصابة بطفيلي *G.lamblia*

بينت نتائج أستخلاص 100 عينة براز للمرضى التي أظهرالفحص المجهري وجود طفيلي *G. lamblia* فيها والتي أختيرت بشكل عشوائي الى أحتواء (41) عينة منها على المادة الوراثية DNA للطفيلي وبنسبة 41 % وعند ترحيلها كهربائيا على هلام الاكاروز 1.5% وفحصها تحت الاشعة فوق البنفسجية UV- light كما في الشكل (1).



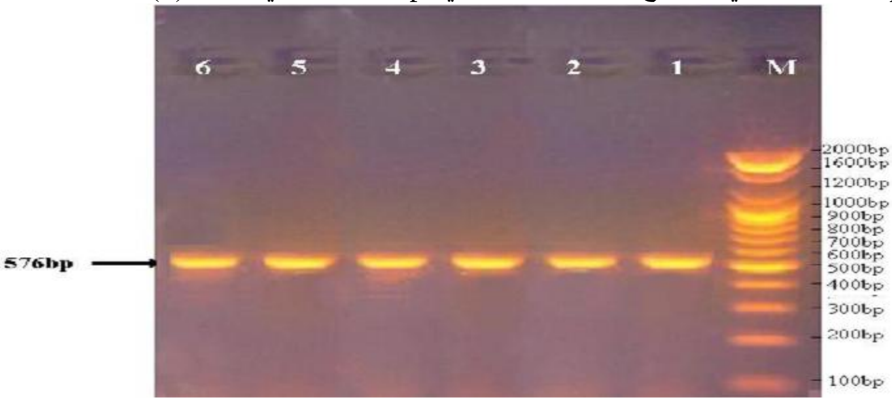
شكل (1) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) مع صبغة بروميد الاثيديوم لنواتج أستخلاص الـ DNA لعينات براز الانسان عند الظروف (60 فولت وبزمن 1.5- 2ساعة) بأستخدام فحص الـ PCR.



نواتج جين (Tpi) بأستعمال فحص الـ PCR

شكل(2) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 1.5 غم مع صبغة بروميد الاثيديوم لنتائج تضخيم بادئات جين Tpi للنمط الوراثي لطفيلي *G. lamblia* بأستخدام تقنية الـ PCR في الظروف (فرق جهد =60 فولت ، الزمن 2-1.5 ساعة حيث أن (M)= سلم القياس DNA ladder ، (P8-P1) = العينات الحاوية على DNA الطفيلي للنمط الوراثي(A).

أظهرت نتائج تضخيم البادئات النوعية Spesific Primer لجين (Tpi) للانماط الوراثية A , B الخاصة بطفيلي *G.lamblia* أن جين Tpi للنمط الوراثي A يقع عند الوزن الجزيئي 576 bp كما في ا لشكل (2) وأن جين Tpi للنمط الوراثي B يقع عند الوزن الجزيئي 208 bp كما في الشكل (3).



شكل(3) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 1.5 غم مع صبغة بروميد الاثيديوم لنتائج تضخيم بادئات جين Tpi للنمط الوراثي لطفيلي *G. lamblia* بأستخدام تقنية الـ PCR في الظروف (فرق جهد =60 فولت ، الزمن 2-1.5 ساعة حيث أن (M)= سلم القياس DNA ladder ، (P8-P1) = العينات الحاوية على DNA الطفيلي للنمط الوراثي(B).

جدول (4): نسبة الاصابة بالأنماط الوراثية لطفيلي *G.lamblia* .

عدد العينات المفحوصة	عدد العينات المصابة	النسبة المئوية للإصابة	عدد العينات المصابة بالنمط الوراثي (A)	النسبة المئوية للإصابة	عدد العينات المصابة بالنمط الوراثي (B)	النسبة المئوية للإصابة
100	41	41	16	39.1	25	%61*

***توجد فروقات معنوية عند مستوى أحتمال $P < 0.05$, t المحسوبة = 16.673 , t = الجدولية = 2.021**

كما بين الجدول (4) أن نتائج فحص الـ PCR لـ (40) عينة براز للمرضى التي ثبت وجود الـ DNA للطفيلي فيها ان 16 عينة منها تحوي على النمط الوراثي A وبنسبة 1 .39 % في حين كان 25 عينة تحوي النمط الوراثي (B) وبنسبة 61 % كما وجد في جدول (4) هذا وأظهرت تقنية الـ PCR خصوصية وحساسية عالية في التحري عن المادة الوراثية للطفيلي حيث بلغت 94.44 % و 89.13% على التوالي.

جدول (5): نسبة الاصابة بالانماط الوراثية لطفيلي *G.lamblia* حسب نوع العينة .

نوع العينة	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات المصابة	% للإصابة	الاصابة بالنمط (A)	% الاصابة	الاصابة بالنمط (B)	% للاصابة
سائل	60	28	46.7*	9	32.2*	19	67.9
شبه سائل	40	13	32.5	4	30.8	9	69.3*
المجموع	100	41	41	13	31.7	28	68.3

*توجد فروقات معنوية مستوى احتمال 0.05 , t المحسوبة للاصابة = 13.421 ، المحسوبة لـ A= 12.125 ، t المحسوبة لـ B= 13.216

يظهر الجدول(5) أن نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة إصابة كانت في العينات السائلة أذ بلغت 46.7% مقارنة بالعينات شبه السائلة التي بلغت 32.5% كما أظهرت النتائج أن أعلى نسبة إصابة بالنمط الوراثي (B) كانت في العينات شبه السائلة أذ بلغت 69.3%مقارنة بالعينات السائلة 67.9% أما بالنسبة للنمط الوراثي (A) كانت أعلى نسبة إصابة في العينات السائلة 32.2% بينما بلغت في العينات شبه السائلة 30.8% واظهر التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $p< 0.05$ بين نوع العينات كما في جدول (5).

جدول (6) : نسبة الاصابة بالانماط الوراثية لطفيلي *G.lamblia* حسب منطقة السكن .

موقع السكن	عدد المفحوصين	عدد المصابين	النسبة المئوية للاصابة %	النمط الوراثي (A)	النسبة المئوية للاصابة %	النمط الوراثي (B)	النسبة المئوية للاصابة
الريف	66	30	45.5*	10	33.4*	20	66.7
المدينة	34	11	32.4	3	27.3	8	72.8*
المجموع	100	41	41	13	31.7	28	68.3

*توجد فروقات معنوية عند مستوى احتمال(0.05)

t المحسوبة للاصابة = 12.441 ، t المحسوبة لـ A= 10.413 ، t المحسوبة لـ B= 9.444

يظهر الجدول (6) أن نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة إصابة كانت في الريف حيث بلغت 45.5% مقارنة بالمدينة التي بلغت 4. 32% ، كما أظهرت النتائج أن أعلى نسبة إصابة بالنمط الوراثي (B) كانت في المدينة حيث بلغت 8. 72% مقارنة بالريف 66.7% ، أما النمط (A) بلغت النسبة في الريف 33.4% وهي أعلى مما هو عليه في المدينة حيث بلغت 27.3% وأظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال $p<0.05$ بين موقعي السكن كما في جدول (6) .

جدول (7): نسبة الاصابة بالأنماط الوراثية بطفيلي *G. lamblia* حسب الجنس .

الجنس	عدد المفحوصين	عدد المصابين	النسبة المئوية للإصابة %	عدد المصابين بالنمط (A)	النسبة المئوية للإصابة %	عدد المصابين بالنمط (B)	النسبة المئوية للإصابة %
الذكور	55	24	43.7*	9	37.5	15	62.5*
الإناث	45	17	37.8	7	41.2*	10	58.9
المجموع	100	41	41	16	39.1	25	58.6

T المحسوبة للاصابة = 12.125، t المحسوبة لـ A = 10.145 ، t المحسوبة لـ B = 15.215

أظهر الجدول (7) أن نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة إصابة كانت عند الذكور التي بلغت 43.7% مقارنة في الإناث التي بلغت 37.8 % كذلك أعلى نسبة للإصابة بالنمط الوراثي (B) كانت في الذكوراذ بلغت (62.5 %) مقارنة بالإناث أذ بلغت (58.9%) . أما النمط الوراثي (A) بلغت نسبته في الذكور(37.5%) بالمقارنة بالإناث أذ بلغت (41.2%) واظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال $P< 0.05$ بين الجنسين كما في جدول(7)

جدول (8): نسبة الاصابة بالأنماط الوراثية لطفيلي *G.lamblia* حسب الفئات العمرية:

الفئة العمرية	عدد المفحوصين	عدد المصابين	النسبة المئوية للإصابة	الاصابة بالنمط الوراثي (A)	النسبة المئوية للاصابة	الاصابة بالنمط الوراثي (B)	النسبة المئوية للاصابة
اقل من سنة	7	6	85.7	2	33.4	4	66.7
5-1	10	4	40	2	50.0	2	50.0
10 -6	6	3	50	1	33.4	2	66.7
15 – 11	5	2	40	1	50.0	1	50.0
20 – 16	12	3	25	1	33.4	2	66.7
25- 21	12	5	41	2	40.0	3	60.0
30 – 26	11	4	36	2	50.0	2	50.0
35 – 31	12	3	25	1	33.4	2	66.7
40 – 36	9	2	22.2	1	50.0	1	50.0
45- 41	8	4	50	1	25.0	3	75.0
≥ 46	8	5	62.5	2	40.0	3	60.0
المجموع	100	41		16	39.1	25	%61
اقل فرق معنوي عند مستوى احتمال (0.05)					5.336		4.459

بين الجدول (8) أن نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة للإصابة كانت ضمن الفئة العمرية اقل من سنة أذ بلغت (85.7 %) بينما بلغت أقل نسبة ضمن الفئة العمرية (36-40) التي كانت (22.2 %) كما أظهرت النتائج أن أعلى نسبة إصابة بالنمط الوراثي(B) عند الفئة العمرية (41-45) سنة أذ بلغت 75.0% وأقل نسبة كانت في الفئة العمرية (11-15) سنة أذ بلغت 50%، أما النمط الوراثي (A) فبلغت أعلى نسبة له ضمن الفئة العمرية (5-1) سنة أذ بلغت 50% واقل نسبة إصابة ضمن الفئة العمرية (41-45) سنة أذ بلغت 25% وأظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية في نسبة الاصابة بين الفئات العمرية عند مستوى احتمال $p< 0.05$. كما في جدول (8).

المناقشة :

أستعمل في الدراسة الحالية فحص تفاعل السلسلة المتبلمرة PCR لغرض تحديد الأنماط الوراثية الخاصة بطفيلي *G.lamblia* في عينات براز الانسان وذلك باستعمال بادئات خاصة لجين Triose phosphate isomerase (*Tpi*)للنمطين الوراثيين A و B للوقوف على مدى انتشار هذين النمطين في محافظة النجف الاشرف.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود جين (Tpi) للطفيلي في 41 عينة من 100 عينة براز تحوي طفيلي *G.lamblia* عن طريق فحصها بالمجهر الضوئي وبنسبة 41%، بينما وجد 59 عينة خالية من جين (Tpi) للطفيلي وبنسبة 59% ربما تعزى العينات السالبة الى وجود نمط جديد وهو A+B أو تعزى الى عدم توفر كميات كافية من عينات الطفيلي لإظهار النتيجة .

أستعمل جين (Tpi) في تشخيص الأنماط الوراثية لطفيلي *G.lamblia* بسبب عدم التجانس الوراثي العالي لهذا الجين وكذلك كونه متعدد الأشكال Polymorphism لذا يعد جين (Tpi) من معلمات التاريخ ألنشوئي الذي استخدم في تحليل التطور الجزيئي والعلاقات التصنيفية لأنواع طفيليات الجيارديا *Giardia* spp ومن خلال التحليلات الجزيئية لهذا الجين تم التوصل الى ان طفيلي *G.lamblia* هو نوع معقد الذي وجد في حيوانات الوعل وفئران المسك والفئران والأرانب والتي تعد المضائف التي لها دور كبيـر في نقل الاصابة الى الانسان (Suluiman *et al.*, 2003). تعتمد ايجابية الفحص بأستخدام تقنية PCR على نوعية وكمية الحامض النووي DNA وعلى درجة نقاوته عن طريق إزالة مجموعة كبيرة ومتنوعة من المثبطات في عينة البراز التي لابد من إزالتها عند الاستخلاص مثل املاح الصفراء Bilirubin salt والسكريات المتعددة المعقدة Complex polysaccharides والمركبات الفنيولية Phenolic compounds ، لذا فان استخدام العدد التجارية في عملية الاستخلاص ، يمكن ان يخفض من هذه الموانع ، كذلك ان الكمية المنخفضة من أكياس الطفيلي يمكن ان يؤثر أيضا على تركيز الـ DNA للعينة التي ستخضع للاستخلاص او تحطيم الحامض النووي DNA خلال عملية حفظ العينات (David *et al.*, 2011). أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان النمط الوراثي (B) هو الأكثر شيوعا من النمط الوراثي (A) حيث كانت عدد العينات المصابة بالنمط الوراثي TpiB (25) وبنسبة 61.0% بينما كان

عدد العينات المصابة بالنمط الوراثي TpiA (16) وبنسبة 39.1% وربما يعود السبب الى ان النمط B يمتلك عوامل ضراوة Virulence Factors أكثر من النمط (A) وبذلك تكون أمراضتيته شديدة Adam *et al.*, (2001) وهذا ما أكدته عدد من الدراسات حيث أجريت دراسة على 208 مريض مصاب بطفيلي *G.lamblia* حيث كانوا غالبية المرضى مصابين بالنمط الوراثي (B) مقارنة بالنمط الوراثي (A) وبنسبة 58.9 % و 12.7% على التوالي (Nash *et al.*, 1992) . ودراسة أجريت على المرضى المصابين بطفيلي *G.lamblia* في استراليا فوجد سيادة النمط الوراثي(B) على النمط الوراثي (A) وبنسبة 70% ، 30% على التوالي . وفي المملكة المتحدة أجريت دراسة على 33 مريض مصاب بطفيلي *G.lamblia* فوجد 64% منهم مصابين بالنمط الوراثي (B) و 27% منهم مصابين بالنمط الوراثي (A) بينما كان 9% من المرضى لديهم اصابة مختلطة من النمطين (A+B) (Read *et al.*, 2004).

كما وبينت نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة إصابة كانت في العينات السائلة حيث بلغت 46.7% مقارنة بالعينات شبه السائلة التي بلغت 32.5% كما أظهرت النتائج أن أعلى نسبة إصابة بالنمط الوراثي (B) كانت في العينات شبه السائلة حيث بلغت 69.3%مقارنة بالعينات السائلة 67.9% أما بالنسبة للنمط الوراثي (A) كانت أعلى نسبة إصابة في العينات السائلة 32.2% بينما بلغت في العينات شبه السائلة 30.8% واظهر التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $p< 0.05$ بين نوع العينات. هذا ما أكده الباحثان Homan & Mank (2001) ان هناك ارتباط قوي بين الإسهال المعتدل والمتوسط مع الاصابة بالنمط الوراثي (A) والإسهال الشديد ألدائمي مع الاصابة بالنمط (B) واثبتا أيضا ان النمط الوراثي A يرتبط بالاسهال المتقطع بينما النمط B مرتبط بالاسهال الدائم المزمن.. وأثبتت دراسة في الأرجنتين ان النسبة الأكبر من الأنماط الوراثية كانت سائدة في العينات السائلة مقارنة بالعينات شبه السائلة حيث بلغت 49% و 88% على التوالي (Amar *et al.*, 2002). واثبت **البرغش** (2008) أن نسبة الاصابة بالانماط الوراثية في العينات السائلة أكثر مما هو عليه في العينات شبه السائلة التي بلغت 85.8 % و 41% على التوالي ، وأن نسبة الاصابة بالنمط الوراثي A في العينات العينات شبه السائلة والسائلة كانت 100% و 0% على التوالي. أما النمط الوراثي B في العينات شبه السائلة والسائلة كانت 16.6 % و 83.3% على التوالي. بينت نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة إصابة كانت في الريف حيث بلغت 45.5% مقارنة بالمدينة التي بلغت 4. 32% ، كما أظهرت النتائج أن أعلى نسبة إصابة بالنمط الوراثي(B) كانت في المدينة حيث بلغت 8. 72% مقارنة بالريف التي كانت 66.7% ، أما النمط (A) بلغت النسبة في الريف 33.4% وهي أعلى مما هو عليه في المدينة حيث بلغت 27.3% .

وهذا ما أكده (1995) Mayrhofer *et al.* أذ أن نسبة جين (Tpi) لطفيلي *G. lamblia* في المناطق الريفية أكثر بحوالي عشر مرات مما هو عليه في المناطق الحضرية والتي بلغت 4.1% ، 0.36% على التوالي. وذكر أن الناس الذين يعيشون في المناطق الحضرية تتوفر لديهم الشروط الصحية الجيدة مقارنة بالمناطق الريفية التي تتواجد فيها الحيوانات التي تكون كمصادر محتملة للإصابة بالطفيلي . واثبت (2000) Thompson وجود الأنماط الوراثية لطفيلي *G.lamblia* في المناطق الريفية أكثر من المناطق الحضرية . وذكر أن الكلاب التي يكثر وجودها في المناطق الريفية تحوي على النمط الوراثي للطفيلي المشترك بين الانسان والحيوان Zoonotic. genotype كما أكد (2003) Comboa *et al.* في دراسته في الأرجنتين أن نسبة جين (Tpi) لطفيلي *G.lamblia* في المناطق الريفية أعلى مما في المناطق الحضرية والتي بلغت 34% و 15% على التوالي.

وبينت نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة إصابة بالانماط الوراثية A و B كانت عند الذكور التي بلغت 43.7% مقارنة في الإناث التي بلغت 37.8 % كذلك أعلى نسبة للإصابة بالنمط الوراثي (B) كانت في الذكورحيث بلغت (62.5 %) مقارنة بالإناث حيث بلغت (58.9%) . أما النمط الوراثي (A) بلغت نسبته في الذكور(37.5%) بالمقارنة بالإناث حيث بلغت (41.2%) واظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال $P< 0.05$ بين الجنسين. هذا ما أكده (2005) Bertrand *et al.* عند دراسته لجين (Tpi) الخاص بطفيلي *G.lamblia* أن 64% من الذكور كانوا مصابين بالنمط الوراثي (B) في حين كان 36% منهم كانوا مصابين بالنمط الوراثي (A) بينما لم يجد (2008) Minivielle *et al.* فروقات معنوية بين نسب اصابة الذكور والإناث بالأنماط الوراثية للطفيلي . في حين ذكر (2011) Molina *et al.*, ان نسبة الاصابة بالنمط الوراثي (B) في الاناث أكثر مما هو عليه في الذكور التي بلغت 51.6% و 48.4% على التوالي .في حين ذكر Supanaranond *et al.*, (1990) أن نسبة الاصابة بالانماط الوراثية في الاناث أكثرمن الذكور أذ بلغت 51.9% و 5.3% على التوالي ، وسجل (2012) Balcioglu *et al.* تفوق نسبة الاصابة بالنمط الوراثي (A) في الاناث والذكور التي بلغت 69.5% و76.0% على التوالي. على نسبة الاصابة بالنمط الوراثي (B) التي بلغت 34.0% و24.0% على التوالي . وبينت نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة للإصابة كانت ضمن الفئة العمرية اقل من سنة حيث بلغت 85.7 % بينما بلغت أقل نسبة ضمن الفئة العمرية (36-40) سنة التي كانت 22.2 % كما أظهرت النتائج أن أعلى نسبة إصابة بالنمط الوراثي(B) عند الفئة العمرية (41-45) سنة حيث بلغت 75.0% وأقل نسبة كانت في الفئة العمرية (11-15) سنة حيث بلغت 50%، أما النمط الوراثي (A) فبلغت أعلى نسبة له ضمن الفئة

العمرية (1-5) سنة حيث بلغت 50% واقل نسبة إصابة ضمن الفئة العمرية (41-45) سنة حيث بلغت 25% وأظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية في نسبة الاصابة بين الفئات العمرية عند مستوى احتمال p<0.05. وهذا ما أكده (1992) Nash *et al.* من خلال فحصه 583 عينة براز للأطفال في جنوب رواندا وبعمر (1-5) سنة بوساطة تقنية الـ PCR فوجد ان نسبة جين (Tpi) لطفيلي *G.lamblia* بلغت 60.1% .كما بينت دراسة في استراليا عند فحص 353 عينة براز للأطفال بعمر (1-5) سنة والذين يعانون من إسهال شديد ودائمي فوجد ان غالبية العينات مصابة بالنمط الوراثي (B).

وكشفت دراسة في أثيوبيا ان الفئات العمرية الصغيرة والمسنين هم أكثر الفئات التي تتعرض للإصابة بالنمط الوراثي (B) وذلك لضعف الجهاز المناعي عند هذه الفئات (Gorezynski *et al.* 2008) وأشار (2008) Minivielle *et al.* ان نسبة جين (Tpi) لطفيلي *G.lamblia* بلغت 71.66% وان النمط الوراثي (A) وجد في الأطفال بعمر أقل من 14سنة بينما النمط الوراثي (B)وجد في كلا الأطفال والبالغين مما يدل على ان النمط (B) هو الأكثر انتشارا. علاوة على ذلك فقد ذكر (2010) . Tungtrongchitr *et al* ان الفئة العمرية (1-5) سنة هي الأعلى من نسبة الاصابة بالأنماط الوراثية للطفيلي والتي بلغت 92% بينما الفئة العمرية (اقل من 50 سنة) فقد كانت نسبة الاصابة لديهم 8% .

المصادر:

المصادر:

1- **البرغش، منهل فاروق احمد (2009)** .التعرف الجزيئي على طفيلي *Giardia duodenalis* والمعزول من الانسان والحيوان بأستخدام تقنية يباين اطوال التقييد لناتج سلسلة تفاعل البلمرة (PCR-RFLP) في جامعة بغداد.110 صفحة.

3- **الراوي، خاشع محمود ، وعبد العزيز خلف الله (2000)** . تصميم وتحليل التجارب الزراعية **.** جامعة الموصل وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . 245 ص.

3- **Adam, R.D (2001)** . Biology of Giardia lamblia . Clin Microbiol. Rev.,14(3): 447-475. .

4-**Amar, C.F.; Dear, P.H.; Pedaza-Diaz, S.; Looker, N.; Linnane, E. and Mclauchlin, J. (2002).** Sensitive PCR-RFLP assay for detection and genotyping of *Giardia duodinalis* in human feces. Clin. Microbial. J., 40(2): 446-452.

5- **Balamurngan, V.; Bhanuprakash , V.; Hosamani , M.; Jayappa , K. D.; Venkatesan , G.; chauhan , B.; Singh , R.K.; (2009).** Apolymerase chian reaction strategy for the diagnosis of complex **.** J. vet . Diagn . Invest. 21, 231-237.

6- **Balcioglu, C.; Kurt, O.; Sevil, N.; Dagci, H.; Tetik, A.; Ergunay, A .;Yereli, K.; Ozilgn,A.; Turg, N. ; Ozensoytoz , S.; (2012)** . Genotping of *Giardia lamblia* in aCohort of Genotypes. Kafka between Symptoms and aRelationsip Trkish Patients A Search for Univ Vet Fak Derg , 18 .A125- A131.

7- **Bertrand, I. C.; Gantzer, T.; Chesnot, and J. Schwartzbrod. (2004).** Improved specificity for *Giardia lamblia* cyst quantification in wastewater by development of a real-time PCR method**.** J. Microbiol. Methods **57:**41–53.

8-**Bera, B. C. ; Shanmuga sundarm, K.; Venkatesan G.;Virmomi, N**, **RiyeshT.(2011)** Zoonotic cases **.** of Comel Pox infection in india Vet . Microbiol . 152(1-2) .29-38.

9-**David, E.B; Coradi, S.T.; Oliveira**–Sequeira .TCG, Ribolla PEM,Katagiri, **S. Guimaraes, S. ; (2011)** :the journal of venomous Animals and Ting oxins including Tropical Diseases**.** 17(2): 209-215**.**

10-**Gamboa, M.; Basualdo, J.; Córdoba, M.; Pezzani, B.; Minvielle, M.; Lahitte, H.; (2003)**. Distribution of intestinal parasitoses in relation to environmental and sociocultural parameters in La Plata, Argentina**.** J Helminthol 77: 15-20.

11-**Gorozynski, R.M.; Terzioglu, E.;(2008)** Aging and the immune system**.** *Int Urol Nephrol.* 40:1117–25. [PubMed].

12-**Homan, W.L.;Mank, T.G.; (2001)** Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. Int J Parasitol; 31:822–826.

13-**Mayrhofer, G.; Andrew, R.H.; Chilton, N.B.(1995)** Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci a comparison with *Giardia muris*. *Parasitol*; 111:11–7.

14 **-Melzak,K.A. et al.(1996).** J Colloid and Interface Sci., 181, 635-644. 14

15- **Molina,N.; Polverino, D.; Minvielle, M. and Basualdo, J. (2007).** PCR amplification *Giardia lamblia* in formalin fixed feces**.** Rev Latinoam. Microbiol; 49(1-2): 6–11**.**

16-**Minivielle, M.C.; Molina, N.B.; Polverino , D. and Basualdo, J.A. (2008) .** First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina , South America. Mem .In st . Oswaldo , Riode Janeiru, Vol .103 : 98-103.

17-**Nash, T.E.; Mowatt, M.R.; (1992)**. Identification and characterization of a Giardia lamblia group-specificgone.ExpParasitol;75:369-375.

18-**Pospiech, T.; and Neumann, J. (1995).** In genomic DNA isolation T. Kieser eds. John Innes center. Norwich. NR4 7UH. U.K**.**

19-**Read, C.M.; Monis, P.T. and Thompson, R.C. (2004).** Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect. Genet. Evol; 4(2):125-130.

20-**Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; and Maniatis. T. (1989).** Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

21-**Suliaman, I.M.; Fayer, R.; Bern, C.; Gilman, R.H.; Trout, J.M.; Schantz, P.M.; Das, P.; Lai, A.A. and Xiao, L. (2003).** Trisephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis.* Emerging Infection Disease, 9: 1444-1452.

22- **Supanaranond, W.; Migasena**, **S.; Pitisuttitham, P.; Suntharasamai, P.;(1990).** Health status of Thai volunteers in a cholera vaccine trial. J Med Assoc Thai 73(10):548.

23- **Thompson, R.C.; Hopk. Ns, R.M. and Homan, W.L. (2000).** Nomenclature and genetic grouping of *Giardia* infecting mammals. Parasitology Today 16: 210-213.

24-**Thompson, R.C.A. and Monis, P.T. (2004).** Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. Adv. Parasitol., 58: 69-137.

25-**Thompson, R.C.; Palmer, C.S. and O'Handlely, R. (2008).** Public health and clinical significan**.**

26-**Tungtrongchitr, A.; Sookrury, N.; Indrawattan, N.; Kwangsi, S.; Ongrotchanakun, J.; Chaicumpa, W.; (2010) .***Giardia intestinalis* in Thailand: Identifiction of Genotypes**.** J Health Popul Nutr.28(1): 42-52.

27-**Yason,J.A.D.L.and Rivera , W.L . (2007).**Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates amonge residents of slum area Monila Philipine parasitology Research, 101: 681-687.

28-**Yoder, J.S.; Harral, C. and Beach, M.J. (2010).** Giardiasis surveillance- united states, MMWR Survill Summ., 59 (6): 15-25.