استخدام تقانةالــ PCR في الكشف عن الجياردیا على الخضار والمياه المروية في ريف دمشق

رحيم أبو الجدايل[1] و صباح يازجي[2] و وسيم محسن[3]

الملخَّص

نُفذ البحث في الموسم 2011-2012 في مخابر قسم التقانات الحيوية التابع للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بهدف الكشف عن وجود بيوض *Giardia* على 120 عينة شملت 40 عينة مياه ري و80 عينة خضار جُمعت عشوائياً من عشر مناطق زراعية مختلفة ضمن محافظة ريف دمشق باستخدام تقانة الـPCR. بَيّنت نتائج الدراسة بعد فصل نواتج تفاعلPCR أن النسبة المئوية للتلوث بـ *Giardia* كانت 25.8%، موزعةً على 37.5% في عينات مياه الري و20% في عينات الخضار. تَبيّن وجود بيوض النوع *G. lamblia* في 15 عينة من أصل المجموع الكلي للعينات توزعت على 7 عينات مياه ري و8 عينات خضار. أعطت منطقة مسرابا أعلى نسبة تلوث 41.6% بالنسبة إلى الجنس *Giardia* و25% بالنسبة إلى النوع *G. lamblia* ودون فرق معنوي مع منطقة الكفرين التي أظهرت أقل نسبة تلوث (8.33%) بالنسبة لـ *Giardia*، G وخلوها من بيوض النوع *G. lamblia*. أكدت هذه الدراسة أهمية تطبيق طرائق البيولوجيا الجزيئية في الكشف عن وجود هذا الطفيلي على الخضار والمياه المروية بها، وقد أظهرت أزواج المرئسات المستخدمة نوعية وحساسية عاليتين في الكشف عن الجنس *Giardia* وتمييز النوع الممرض للإنسان *G. lamblia*.

الكلمات المفتاحية: الـ *Giardia*، مياه الري، الخضار، تقانة الـ PCR. غوطة دمشق.

[1] طالب الماجستير، [3] دكتور في التقانات الحيوية،الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، ص.ب. 7702، دمشق، سورية.
[2] أستاذه، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

Using PCR technique to detect the *Giardia* on vegetables and irrigation water in Damascus Countryside

Abu-Aljadael, R.[(1)], S. Yazagi[(2)] and W. Mohsen[(3)]

Abstract

This investigation was carried out during 2011–2012 season at the biotechnology department\General Commission for Scientific Agricultural Researches in order to detect the presence of *Giardia* Cysts on fresh vegetables and irrigation water using PCR technique to detect the status of *Giardia* cysts in ten different agricultural areas of Damascus Countryside. 120 samples including, 40 irrigation water and 80 vegetables samples were randomly collected and tested. Out of 120 samples examined, only 25.8 % were contaminated with *Giardia* cysts and these included 37.5% of irrigation water samples and 20% of fresh vegetables samples. *G. lamblia* cysts were detected in 12.5% of examined samples, 17.5% of irrigation water samples and 10% of fresh vegetables samples. The majority of contaminated samples (41.6%), (25%) for *Giardia* and *G. lamblia*, respectively were from Misraba area without statistically significant with Kafrein area, which showed the lowest contamination with *Giardia* cysts (8.33%) and was free of *G. lamblia* cysts. This study confirmed the importance of application of molecular biology methods in the detection of *Giardia* on vegetables and their Irrigation water, since used primers showed high specificity and sensitivity in the detection of the *Giardia* genus and discriminate the Human pathogenic type, *G. lamblia.*

Keywords: *Giardia*, Irrigation water, Vegetables, PCR Technique. Damascus countrtside.

[(1)] Master Student, [(3)]Doctor, Department of Biotechnology ,GCSAR, Ministry of Agric.& Agra Reform, P.O.Box 7702, Damascus, Syria.
[(2)] Professor, Dep. food Sci., Fac. Agric., Damascus University, Syria.

المقدمة

ازداد الاهتمام مؤخراً باستخدام مياه الصرف الصحي في ري المحاصيل الخضرية في المناطق الجافة وشبه الجافة نظراً إلى التغيرات المناخية التي أدت إلى قلة مصادر المياه، وكذلك الحاجة إلى زيادة الإنتاج الزراعي المحلي، إلا أن استخدامها يُشكّل خطراً حقيقياً على البيئة والإنسان فهي تُعدُّ سبباً لتلوث البيئة من جهة، وخطراً مباشراً على الصحة من جهة أخرى، وتسببها في تفشي العديد من الأمراض، التي تنتقل مسبباتها إلى الإنسان بالتلوث العرضي للمحاصيل الخضرية المروية بهذه المياه أو نتيجةً لتلوث منتجات المزرعة الغذائية بأيدي عمال المزرعة. تعدُّ الطفيليات مؤشراً حيوياً مهماً على حدوث التلوث العرضي للمحاصيل الزراعية ومياه ري الصرف الصحي، ويعدُّ جنس *Giardia* أحد أكثر أجناس الطفيليات المعوية المسببة للإسهال انتشاراً عالمياً (Adam، 1991؛ Lebbed، 2010) وقد اكتُشفت هذه الطفيليات المعوية أول مرة Antony van Leeuwenhoek قبل 330 عام. ولكن استغرق قرابة 200 عام حتى أطلق عليها التسميه، وأعاد lambl (1859) اكتشافها وأطلق عليها اسم *Cercomonas intestinalis*، وأطلق Kunstler (1882) الاسم الشائع *Giardia* على السوطيات (*G. Agilis*) التي وجدت في الشراغيف، حالياً توجد العديد من التسميات التي أُطلقت على الأنواع التي تصيب الإنسان مثل: *G.doudinalis* و*G.intistinalis* و*G.lamblia*، (Adam، 2001). يتبع جنس *Giardia* لشعبة وحيدات الخلية وصف السوطيات وتحت العائلة Hexamitida ويضم خمسة أنواع، ولعل النوعين *G. Lamblia* و*G.muris* الأكثر انتشاراً، ويعدُّ *G. muris* النوع الذي يصيب القوارض دون الإنسان، في حين يُعد *G. lamblia* النوع الوحيد الذي يصيب الإنسان، فضلاً عن أنواع أخرى من الثدييات (Thompson، 1988) وتتكون دورة حياة هذا النوع من طورين متتاليين هما طور النواشط، التي تعيش داخل الأمعاء وتسبب أمراضاً معوية تعرف بداء الجيارديا، وطور البيوض Cysts وهو الطور البيئي المقاوم، إذ يمكنها البقاء مدة طويلة تصل إلى عدة أشهر في المياه السطحية وعوادم الصرف الصحي، ومن ثم تنتقل إلى الإنسان بالطرائق المباشرة أو غير المباشرة (Dawson، 2005) وتختلف نسب التلوث بها تبعاً لدرجة التلوث البرازي ومدى استخدام المياه السطحية الملوثة (Hansen وOngerth، 1991؛ LeChevallier وزملاؤه، 1991) . تعدُّ الخضر الطازجة، وخاصة الورقية غير النظيفة والمروية بمياه الصرف الصحي الناقل الرئيسي (Erdogrula وSenerb، 2005). ذكرت العديد من الدراسات في السنوات القليلة الماضية وجود ارتفاع متزايد في حالات انتشار الأمراض المتعلقة بتلوث الغذاء وازدياد انتشار الطفيليات المعوية، وخاصةً في الدول النامية (Hassan وزملاؤه، 2012) إذ يراوح انتشار العدوى بـ *Giardia* بين 2-7 % في البلدان المتقدمة وتصل حتى % 40 في البلدان النامية والمناطق المدارية وشبه المدارية، حيث ظروف التعقيم والنظافة العامة تكون منخفضة(Odoi وزملاؤه، 2004) فضلاً عمَّا ذُكر، فإنَّ هذه البيوض تتميّز

بمقاومة عالية للتراكيز المستخدمة من الكلور في معالجة المياه وتعقيمها مقارنة بالبكتيريا (Dawson، 2005) هذه الخصائص جميعها، فضلاً عن انخفاض كمية البيوض اللازمة لإحداث العدوى (Ortega-Pierres وزملاؤه، 2009) وعدم وجود آلية فعالة لمعالجة هذه الطفيليات ومنع انتشارها بالمياه، جعلتها واحدة من أكثر العوامل الممرضة خطورة على سلامة وصحة المستهلك. هناك العديد من الطرائق المخبرية للكشف عن هذه الطفيليات من مصادرها المختلفة، منها الطرائق التقليدية التي تجري بالفحص المجهري والطرائق المناعية مثل الـ DFA, ELISA والطرائق الجزيئية التي تعتمد على العديد من التقانات مثل PCR, RFLP, Real-Time PCR، ولكل من هذه الطرائق ميزاتها ومساوئها، فتُعدُّ الطرائق التقليدية الأكثر انتشاراً؛ وذلك لانخفاض كلفتها، إلا أنها تتأثر بعوامل كثيرة تتعلق بالخبرة الشخصية في القدرة على تمييز هذه البيوض عن الأنواع الأخرى المشابهة (Lebbad، 2010)، في حين تتميز الطرائق المناعية بقدرة عالية على تمييز وجود هذه البيوض مقارنة بالطرائق التقليدية، إلا أنها غير متاحة في كثير من مخابر التشخيص لارتفاع تكلفتها وحاجتها إلى تجهيزات خاصة، وإلى خطوات عمل إضافية بغية الحصول على النقاوة العالية الضرورية لنجاح الاختبار (Zimmerman وNeedham، 1995)، وتتميّز الطرائق الجزيئية بنوعية وحساسية عاليتين وحاجتها إلى جهد عمل أقل، إذا ما قورنت بالطرئق التقليدية (Verweij وزملاؤه، 2007) فضلاً عن قدرتها على التمييز بين أنواع الجنس الواحد، ففي الوقت الحالي تُستخدم طرائق البيولوجيا الجزيئية على مستوى واسع حول العالم، باستخدام مرئسات متخصصة للجنس أو النوع، وللعديد من المورِثات مثل: GP60 60 وSSU rRNA وَ18S rRNA (Mabbubani وزملاؤه، 1992؛ Weiss وزملاؤه، 1992).

ونظراً إلى قلة المعلومات والدراسات المتوافرة عن انتشار الطفيليات المعوية على الخضار الطازجة وفي المياه المروية بها في منطقة ريف دمشق، وإلى ضرورة توافر معلومات تساعد على اتخاذ الإجراءات اللازمة لمعالجة المياه العادمة لضمان سلامة الغذاء التي تحول دون انتشار الأمراض المعوية، فيعد التحري عن أحد أكثر الطفيليات الممرضة (*Giardia*،) للإنسان انتشاراً حول العالم.

الأهداف

1- الكشف عن بيوض جنس *Giardia* والنوع *G. Lamblia* في مياه الري وعلى الخضار المروية بها في محافظة ريف دمشق.

2- تحديد حالة هذه الطفيليات وتوّزعها في مناطق الدراسة.

3- تقديم طريقة عمل واضحة للكشف عن هذا الطفيلي على الخضار التي تؤكل طازجة باستخدام تقانة الـ PCR.

مواد البحث وطرائقه

العينات:

أُجري الكشف عن وجود الـ *Giardia* والـ *G. lamblia* في 120 عينة توزعت على 40 عينة مياه ري و80 عينة خضار التي جُمعت عشوائياً، من عشر مناطق زراعية مختلفة في محافظة ريف دمشق، أي بمعدل 4 عينات مياه ري و8 عينات خضار من كل منطقة، وذلك خلال المدة الواقعة بين العام 2011 و2012، حيث جُمعت العينات من المناطق التي تتركز فيها زراعة الخضار في الغوطة الشرقية والغربية (داريا وبيت سوا وحمورية ومسربا والكفرين وكناكر ودير العصافير ودوما والمعضميه والعباده)، وشملت عينات الخضار المدروسة 10 أنواع نباتية مختلفة هي الخس، والبقدونس، والكزبرة، والفجل، والنعناع، والبصل أخضر، والسبانخ، والبقلة، والطرخون فضلاً عن الفول الأخضر. وضعت هذه العينات في أوعية نظيفة، وأُعطيت رقماً مُميّزاً لكل عينة، فضلاً عن تدوين نوع العينة وتاريخ الجمع واسم المنطقة ونوعية ماء الري المستخدم، ثم نُقلت إلى المخبر لتحليلها مباشرةً عند الوصول.

عزل البيوض من عينات الخضار الطازجة:

نقعت كل عينة في وعاء بيشر 500مل يحوي 150مل من محلول الاستخلاص (TBS) (20 mM tris base, 0.5 mM sodium chloride, 0.2% tween 20 and dd water) مع الرج الميكانيكي بسرعة 150 rpm مدة نصف ساعة، ثم رُشح محلول الغسيل عبر شاش معقم وتُرك مدة 45 دقيقة حتى تترسب، وبعدها أُزيلَ الجزء الطافي ونُقل الراسب إلى أنبوب تثفيل 15 مل، وثُفل على سرعة 1500 rpm مدة 5 دقائق، ثم أُزيلَ الجزء الطافي وحفظ الراسب المتبقي، الحاوي على البيوض بإضافة بضع نقاط من محلول 10% formal-saline (Al-Binali وزملاؤه، 2006).

عزل البيوض من عينات مياه الري:

فُلترت عينات مياه الري بعد الجمع ومباشرةً عند الوصول إلى المخبر، خلال منخل قطرثقوبه 2-3mm تقريباً، لإزالة العوالق والأوساخ كبيرة الحجم، ثم فُلترت مرة أخرى بمساعدة مضخة تفريغ عبر فلاتر الترشيح، ولزيادة كفاءة التقاط البيوض على الفلاتر شُكّلت طبقة فلترة مكونة من 5 فلاتر وضعت في قمع الترشيح مع استبدال مستمر للفلتر العلوي بفلتر جديد بالأسفل، وذلك عند ملاحظة انخفاض معدل سرعة الترشيح الناتج عن انسداد الثقوب بحيث تبقى دائماً طبقة الفلترة مكونة من 5 فلاتر، ثم غُسلت الفلاتر بـ 200 مل ماء مقطر يحوي 10% من محلول الغسيل (ماء مقطر+ Tween 20، وبعدها عُزلت بيوض الطفيليات باتباع طريقة التركيز بمحلول السكر المتدرج، بوضع 9 مل في أنبوب تثفيل 15 مل وأضيف إليها 2 مل من محلول (SG 1.27) Sheather's

sugar solution ثم نُقلت بسرعة 3000 rpm مدة 10 دقائق، وجرى التخلص من الجزء الطافي مع الاحتفاظ بالراسب المتكون. استُخدمَت عينات براز حاملة لهذا الطفيلي كشواهد إيجابية (ve+) مقارنة بالماء المقطر المعقم كشاهد سلبي.

استخلاص مادة الحمض الريبي النووي (DNA):

عُزلت الماده الوراثية من بيوض الطفيليات الموجودة ضمن الرواسب الناتجة عن الخطوة السابقة باتباع طريقة التجميد والإذابة المتكررة في الآزوت السائل وبوجود محلول الـــ CTAB (Hexadecyl-trimethylammonium Bromide)، ثم الحصول على مادة DNA بطريقة الفينول - كلوروفورم التقليدية، حيث هُضمتْ مكونات الرواسب، بإضافة 500 ميكرولتر من محلول Tris-EDTA، (باهاء=8) الحاوي على 2 مغ/ مل من أنزيم بروتيناز K إلى أنبوب تثفيل 2 مل يحوي 300µl من الراسب، وحُضن في حرارة 37 درجة مئوية مدة ساعة واحدة، ثم أضيف محلول 1M NaCl وبعدها أضيف محلول الـ 1x CTAB وحُضن في حرارة 65 درجة مئوية مدة نصف ساعة، ثم أجريت عملية التجميد والإذابة المتكررة خمس مرات متتالية بعدها طُبّق بروتوكول طريقة الفينول - كلوروفورم التقليدية، لاستخلاص المادة الوراثية (Rochelle وزملاؤه، 1997؛ Jiang وزملاؤه، 2004) كُشف عن وجود DNA بإجراء رحلان في هلامة أغاروز بتركيز 1%، باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي (شركة Bio Rad) تحت جهد كهربائي 80-90 فولط. ثم قيستْ تراكيز الـ DNA المستخلص ونوعيته باستخدام جهاز المطياف الضوئي. ووُحدت تراكيز الـ DNA عند العينات جميعها إلى 50 نانوغراماً/ميكرولتر باستخدام محلول TE (Tris-EDTA pH 8.0).

مضاعفة الحمض الريبي النووي، الدنا (DNA Amplification):

أُجريت مضاعفة الدنا المستخلص باستخدام أربعة أزواج من المرئسات مصنعة من شركة Metabion international AG (Germany) موضّحة في الجدول (1) زوج المرئسات الأول JW1, JW2 يعمل على تضخيم قطعة بطول 183 bp ضمن المورثة 18S rRNA من جنس *Giardia* وزوج المرئسات الثاني MAH433F-MAH592R يعمل على تضخيم قطعة ضمن المورثة Giardin Gene بطول 218 bp وتميّز النوع *G. lamblia* عن الأنواع الأخرى من جنس *Giardia*، وللتأكد من نتائج عمل هذه المرئسات، اُستخدم زوج المرئسات GspL, GspR لتضخيم قطعة بطول 171 bp من المورثة Giardin Gene من العينات التي أعطت نتيجة إيجابية لـــ *Giardia* مع زوج المرئسات الأول واُستخدمَ زوج المرئسات GMR, GML لتضخيم قطعة بطول 306 bp تميّز النوع *G. muris* على العينات التي أعطت نتيجة إيجابية لـ *G. lamblia*. وذلك باستخدام الـ PCR، حيث أُجريت عملية المضاعفة في جهاز التدوير الحراري (من شركة *Euro Clone*). فُصلت نواتج تفاعل الـPCR على هلامة الأغاروز بتركيز 2%

مع تحميل مؤشر قياسي لِـــ DNA (Gene Ruler 100bp plus DNA ladder من شركة Fermentas). شوهدت وصورت الحزم الظـــاهرة بوجـــود الأشـــعة فـــوق البنفـــسجية UV-light باستخدام جهاز التوثيق (LABORTECHNIK TCP26 M, EEC).

الجدول (1) المرئسات المستخدمة وتسلسلها النيكليوتيدي، والوزن الجزيئي للحزم الناتجة.

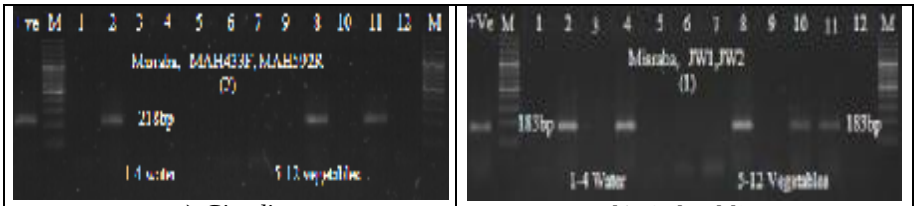
اسم المرئس	الوزن الجزيئي (bp)	حرارة الالتحام	التسلسل ($5' \rightarrow 3'$) Forward / Reverse	المرجـــع
JW1 JW2	183	50°	F:5´GCGCACCAGGAAT GTCTTGT-3´ R:5´TCACCTACGGA TACCTTGT-3´	(Weiss وزملاؤه، 1992)
GspL GspR	171	55°	F:5'-AAG TGCGTC AAC GAG CAG CT-3´ R:5'-TTA GTG CTT TGT GAC CAT CGA-'3´	(Mahbubani وزملاؤه، 1991؛ Ionas وزملاؤه، 1997؛ Bogomolni وزملاؤه، 2008)
MAH433F MAH592R	218	65°	F:5'-CATAACGACGCCA TCGCG GCTCTCAGGAA-3' R:5'-TTTGTGAGCGCTTC TGTCGTGGCAGCGC TAA-3'	(Rochelle وزملاؤه، 1997؛ Mahbubani وزملاؤه، 1991؛ Ionas وزملاؤه، 1997)
GML GMR	306	60°	F:5'-CAT AAA TCA GTG CAGAGT GTT TC-3' R:5'-GAG GAA TCA TCA GAA CCT CGC-3'	(Ionas وزملاؤه، 1997)

أُجريَ التحليل الإحصائي للتجارب باستخدام البرنامج SPSS لتحديد الفـــروق المعنويـــة على مستوى ثقة 95% للنسب المئوية لوجود الطفيليات بحسب مناطق أخذ العينات.

النتائـــج والمناقشة

بينت نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR للعينـــات المدروســـة أن منطقـــة مسرابا كانت الأكثر تلوثاً من بين المناطق المدروسة (الصورة a-1) باســـتخدام المـــرئس JW1, JW2 الذي يحدد الجنس *Giardia*، ومنه نجد أن العينات ذات الأرقام 2,4,8,10,11 إيجابية لـِ *Giardia*، حيث انفصلت عند وزن جزيئي قدره 183 bp، وهو الطول ذاتـــه الذي انفصل عنده الشاهد الإيجابي (+Ve) لـِ *Giardia*، وتبـــيّن الـــصورة (b-1) نتـــائج الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR باستخدام المرئس MAH433F, MAH592R الذي

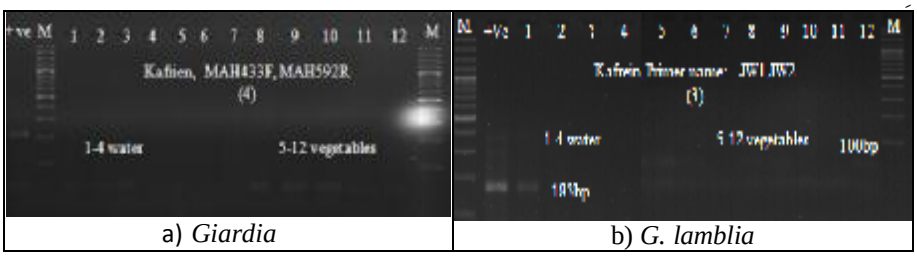
يحدد النوع الممرض*G. lamblia* ومنه نجد أن العينات ذات الأرقام 2,8,11 فقط إيجابيــة له، إذْ انفصلت عند وزن جزيئي 218 bp، وهو الطول نفسه الذي انفصل عندها الــشاهد الإيجابي (+ve) لــ *G. lamblia*، حيث تمثل العينات من 1 إلى 4 عينــات ميــاه الــري والعينات من 5 إلَى 12 عينات الخضار، ومن ثمَّ توزعت العينات الملوثة بـــِ *Giardia* على 37.5% من عينات الخضار و50% من عينات مياه الري، منها 25% عينة خــضار و25% عينة مياه ري ملوثة بالنوع *G.lamblia*.



a) *Giardia* b) *G. lamblia*

الصوره (1) نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR من عينات منطقة مسرابا.

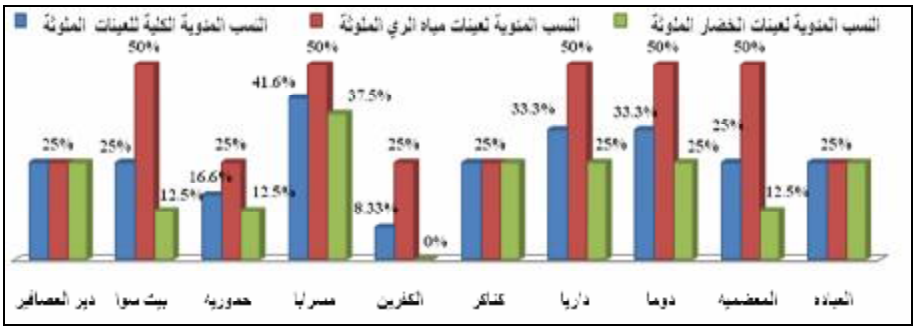
وكذلك تبيّن من خلال دراسة نتائج الرحلان الكهربائي أن منطقة الكفرين كانت أقــل المناطق تلوثاً، إذْ تُظهر الصورة (2-a) نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR مــن عينات منطقة الكفرين باستخدام المرئس JW1, JW2، ومنه نجد أن العينة رقــم 1 فقــط كانت إيجابية لــِ *Giardia*، حيث انفصلت عنــد وزن جزيئــي قــدره 183 bp، وتُبــيّن الصورة (2-b) نتائج الرحلان الكهربــائي لنــواتج تفاعــل PCR باســتخدام المــرئس MAH433F- MAH592R، ومنه نجد أن العينات جميعها كانت خالية من التلوث بالنوع *G. lamblia*، ومن ثمَّ توزعت العينات الملوثة على عينة مياه ري واحــدة فقــط ملوثــة بـــِ *Giardia*.



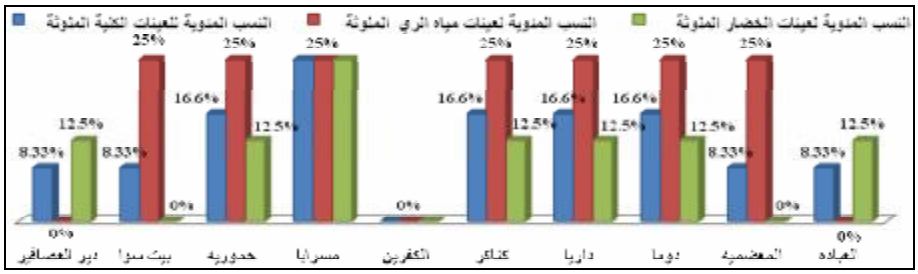
a) *Giardia* b) *G. lamblia*

صورة (2) نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج PCR من عينات منطقة الكفرين.

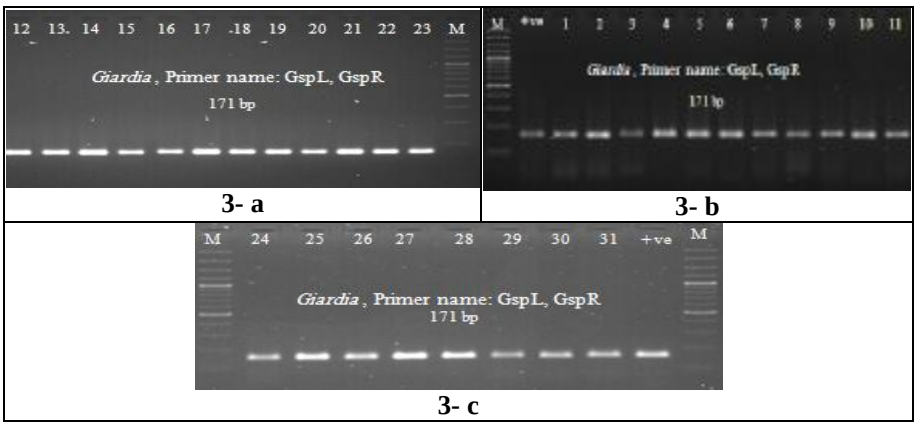
وتبيّن لدى دراسة نسب التلوث وتوزعها بحسب المناطق المدروسة والموضحة بالشكلين (1) و(2) أن ثلاث عينات من أصل العينات الاثنتي عشرة (33.3%) المجموعة من منطقة كناكر كانت ملوثة بـ *Giardia* توزعت على عينتي خضار من أصل عينات الخضار الثماني (25%) وعينة مياه ري واحدة (25%) من أصل عينات المياه الأربع المدروسة (الشكل1)، وقد وجد أن عينة خضار واحدة فقط ملوثة بالنوع *G. lamblia* وأن عينة المياه الوحيدة الملوثة كانت ملوثة بالنوع *G. lamblia* (الشكل2)؛ وذلك عند تطبيق زوج المرئسات MAH433F, MAH592R. أمَّا عينات منطقة حمورية فقد حوت على عينتين (16.6%) ملوثتين بـ *Giardia* موزعة على عينة خضار (12.5%) وعينة مياه ري واحدة (25%)، وقد وُجد أن كليهما من النوع الممرض *G. lamblia*، وحوت العينات المجموعة من منطقة دوما على ثلاث عينات (33.3%) ملوثة بـ *Giardia* توزعت على عينتي خضار (25%) وعينتي مياه ري (50%) منها عينة خضار (12.5%) وعينة مياه ري (25%) ملوثة بالنوع *G. lamblia*، وبالنسبة إلى عينات منطقة العبادة، فقد وجد ثلاث عينات (25%) ملوثة بـ *Giardia* توزعت على عينة مياه ري (25%) و عينتي خضار (25%) منها عينة واحدة فقط ملوثة بالنوع *G. lamblia* أمَّا عينات مياه الري فقد كانت خالية من هذا النوع، وبالنسبة إلى عينات منطقة داريا فقد وُجدت أربع عينات (33.3%) ملوثة بـ *Giardia* موزعة على عينتي خضار (25%) وعينتي مياه ري (50%) منها عينة خضار وعينة مياه ري ملوثة بالنوع *G. lamblia*، وفي منطقة المعضمية توزعت العينات الملوثة بـ *Giardia* على عينة خضار (12.5%) وعينتي مياه ري (50%) منها عينة مياه واحدة ملوثة بالنوع *G. lamblia*. أمَّا عينات الخضار فقد كانت خالية من هذا النوع، وفي منطقة دير العصافير توزعت فيها العينات الملوثة على عينتي خضار (25%) وعينة مياه ري (25%) ملوثة بـ *Giardia* منها عينة خضار واحدة فقط ملوثة بالنوع *G. lamblia*، مع خلو عينات مياه الري منه، أمَّا بالنسبة إلى عينات منطقة بيت سوا فقد توزعت العينات الملوثة فيها على عينة خضار (12.5%) وعينتي مياه ري (50%) ملوثة بـ *Giardia* منها عينة مياه واحدة فقط ملوثة بالنوع *G. lamblia* مع خلو عينات الخضار جميعها منه. من دراسة نتائج الاختبار التأكيدي للمرئسات، وجد أن العينات الإيجابية جميعها للجياردیا (31 عينة) مع زوج المرئسات JW1, JW2، كانت إيجابية أيضاً مع زوج المرئسات GspL, GspR بإعطائها حزمة واحدة بوزن 171 bp الصورة (3-a,b,c)، والعينات جميعها التي أعطت نتيجة إيجابية لـ *G. lamblia* (15 عينة) مع زوج المرئسات MAH433F, MAH592Rأعطتَ نتيجة سلبية مع زوج المرئسات GMR, GML المميّز للنوع *G. muris*.



الشكل (1) توزع النسب المئوية للعينات الملوثة بالــ *Giardia* بحسب المناطق المدروسة.



الشكل (2) توزع النسب المئوية للعينات الملوثة بالــ *G. lamblia* بحسب المناطق المدروسة.



الصوره (3)نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR باستخدام زوج المرئساتGspL, GspR.

بيّنت الدراسة الإحصائية أن النسبة المئوية للتلوث بـِ *Giardia* كانت (25.8 %)، إذْ إنَّ 31 عينة من المجموع الكلي للعينات كانت إيجابية لـِ *Giardia*، وتوزعت هـذه النـسبة على 37.5 % من عينات مياه ري و20 % من عينات الخضار، إذْ إنّ 15 عينة من عينات

مياه الري و16 عينة من عينات الخضار المدروسة كانت ملوثة بـ*Giardia*، في حين أن النسبة المئوية للتلوث بالنوع *G. lamblia* كانت 12.5% إذْ إنّ 15 عينة من المجموع الكلي للعينات المدروسة كانت إيجابية لـ *G. lamblia*، موزعة على 17.5% من عينات مياه الري و10% من عينات الخضار المدروسة، وتقاربت هذه النسبة مع ما ذكره Chaidez وزملاؤه (2005)، إذْ وَجد أن نسبة التلوث بهذا الطفيلي في عينات مياه الري كانت 50%، ووجد Thurston-enriquez وزملاؤه (2002). في الولايات المتحده الأمريكية أن نسبة التلوث بـ *Giardia* وصلت إلى 60%، ومن جهة أخرى فإن هذه النتائج توافقت مع Hassan وزملاؤه (2012) أن نسبة التلوث بـ *Giardia* على الخضار الطازجة في مدينة الاسكندرية – مصر كانت 8.2%، وكذلك وجد Abougrian وزملاؤه أن نسبة التلوث بـ*Giardia* في مدينة طرابلس- ليبيا كانت 10%. ومن دراسة النسب المئوية للتلوث في الشكل (1 و2) لوحظ ارتفاع هذه النسبة في منطقة مسرابا بالنسبة إلى وجود *Giardia* و*G. lamblia* مقارنة بباقي مناطق الدراسة، إذْ كُشف فيها أعلى نسبة تلوث (25%) بالنسبة إلى وجود *Giardia* و(41.6%) بالنسبة إلى وجود النوع *G. lamblia*، ودون فروق معنوية مع منطقة الكفرين التي أظهرت أقل نسبة تلوث بـ (8.33%) *Giardia* مع خلوها من بيوض النوع *G. lamblia*. أظهرت الدراسة الإحصائية لنسب التلوث عدم وجود فروق معنوية بين المناطق المدروسة من حيث وجود الجنس *Giardia* والنوع *G. lamblia* ومن جهة أخرى، بيّنت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية ($0.05 > p$) بين نسب تلوث عينات مياه الري وعينات الخضار بالنسبة إلى وجود *Giardia* إذْ كانت نسبة التلوث أعلى في عينات مياه الري (37.5%) مقارنةً بعينات الخضار (20%)، في حين أظهرت الدراسة الإحصائية عدم وجود فروق معنوية بين نسب تلوث عينات مياه الري وعينات الخضار بالنسبة إلى وجود النوع *G. lamblia*، مع بقاء نسبة التلوث أعلى في عينات مياه الري (17.5%) مقارنةً بعينات الخضار (10%) وهذا يرتبط بقدرة الطفيلي على مقاومة ظروف البيئة، إذْ تفقد البيوض قدرتها على الاستمرار والانتقال من المياه إلى المسطح الورقي للنبات بمرور الزمن. تطابقت النتائج السابقة مع الملاحظات التي دُونت ميدانياً، إذْ لوحظ أن أقنية مياه الصرف الصحي تشكل المصدر الرئيسي لمياه الري (70%) في منطقة مسرابا، إذ يقوم المزارعون باستجرار الماء عبر قنوات فرعية من المجرى الرئيس للصرف الصحي القادم من منطقة دوما باتجاه بساتين مسرابا وبيت سوا ومن ثم إلى منطقة الحمورية، ومن دراسة النسب المئوية للتلوث ومقارنتها بـ *Giardia* في المناطق المتتالية التي يمر بها هذا المجرى، لوحظ حدوث انخفاض في هذه النسبة كلما ابتعدنا عن المصدر الرئيس للمجرى، فقد انخفضت النسبة إلى (16.6%) في منطقة حمورية مقارنة بنسب التلوث العليا في منطقة بيت سوا (25%) ومسرابا (41.6%) الواقعة قبل منطقة حمورية بالنسبة إلى المجرى الرئيس، أمَّا بالنسبة

إلى عينات منطقة الكفرين فإنَّ هذه القرية تُعدُّ من القرى النموذجية في ريف دمشق وتكاد تُعدُّ الآبار الارتوازية المصدر الرئيس، وشبه الوحيد لمياه الري، فأظهرت أقل نسبة تلوث من بين المناطق المدروسة.

واستُنتج بأن نسبة العينات الملوثة بلغت بـــ *Giardia* (25.8%) وبـــ *G.lamblia* (12.5%)، وارتفاع نسبة التلوث في عينات مياه الري مقارنة بعينات الخــضار؛ وذلــك بالنسبة إلى الجنس *Giardia* والنوع *G. lamblia*.

واقتُرح بضرورة إجراء دراسات مشابهة لتوسيع نطــاق الدراســة لتــشمل منــاطق ومحافظات أخرى من القطر ومقارنتها بالنتائج في محافظة ريف دمشق، وأن تشمل أجناس وأنواع أخرى من الطفيليات.

References

Abougrain, A. K., Nahaisi, M. H., Madi, N. S., Saied, M. M. and Ghenghesh, S. G. (2009). Parasitological contamination in salad vegetables in Tripoli-Libya. Food Control , 26:500-503.

Adam, R. D. (1991). The biology of *Giardia* spp. Microbiological Reviews 55, 706–773.

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

Al-Binali, A. M., Bello, C. S., EleShewy, K., and Abdulla, S. E. (2006). The prevalence of parasites in commonly used leafy vegetables in South Western, Saudi Arabia. Saudi Medical Journal, 27: 613-616.

Bogomolni, A. L., Gast, R. J., Ellis, J. C., Dennett, M., Pugliares, K. R., Lentell, B. J., and Moore, M. J. (2008). Victims or vectors: a survey of marine vertebrate zoonoses from coastal waters of the Northwest Atlantic. Disease Of Aquatic Organism, 81: 13–38.

Chaidez, C., Soto, M., Gortares, P., and Mena, K. (2005). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in irrigation water and its impact on the fresh produce industry. International Journal of Environmental Health Research, 15(5): 339 – 345.

Dawson, D. (2005). Foodborne protozoan parasites. International Journal of Food Microbiology, 103: 207- 227.

Erdogrula, Ö., and Senerb, H. (2005). The contamination of various fruit and vegetable with *Enterobius vermicularis*, *Ascaris* eggs, *Entamoeba histolyca* cysts and *Giardia* cysts. Food Control, 16: 557-560.

Hansen, J. S., and Ongerth, J. E. (1991). Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. Appl. Environ Microbiol, 57:2790 - 2795.

Haque, R., Roy, S., Siddique, A., Mondal, U., Rahman, S. M., Mondal, D., Houpt, E., Petri, W. A., Jr. (2007). Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. Am J Trop Med Hyg 76, 713-717.

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

Ionas, G., Farrant, K.J., McLenachan, 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.

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.

Lebbad, M. (2010). Molecular Diagnosis and Characterization of Two Intestinal Protozoa: *Entamoeba histolytica* & *Giardia intestinalis*.Thesis for doctoral degree (Ph.D.), Swedish Institute for Infectious Disease Control, Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet. Stockholm, Sweden, pp.57.

LeChevallier, M. W., Norton, W. D, and Lee, R. G (1991). Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. Appl. Environ. Microbiol, 56:2610-2616.

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.

Odoi, A., Martin, S. W., Michel, P., Holt, J., Middleton, D. and Wilson, J. (2004). Determinants of the geographical distribution of endemic giardiasis in Ontario, Canada: a spatial modelling approach. Epidemiol. Infect, 132: 967-976.

Ortega-Pierres, M. G., Cacciò, S., Fayer, R., Mank, T., Smith, H., Thompson, R. C. A. (2009). *Giardia* and *Cryptosporidium* From Molecules to Disease.

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

Thompson, R. C. A. (1998). *Giardia* infections. In: Zoonoses: Biology, Clinical Practice and Public Health Control. Oxford University Press, Oxford, pp. 545-561.

Thurston-Enriquez, J. A., Watt, P., Dowd, S. E., Enriquez, R., Pepper, I. L., and Gerba, C. P. (2002). Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. Journal of food Protection, 65(2):378-82.

Verweij, J. J., Blange, R. A., Templeton, K., Schinkel, J., Brienen, E. A., van Rooyen, 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.

Weiss, J. B., Van Keulen, H., Nash, T. E. (1992). Classification of subgroups of *G. lamblia* based upon ribosomal RNA gene sequences using the polymerase chain reaction, Mol Biochem Parasitol.54:73-86.

Zimmerman, S. K., Needham, C. A. (1995). Comparison of conventional stool concentration and preserved - smear methods with Merifluor *Cryptosporidium*/ *Giardia* Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT Giardia EZ Microplate Assay for detection of *G. lamblia*. J Clin Microbiol 33, 1942-1943.

Received	**2012/09/20**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2012/12/19**	**قبول البحث للنشر**