انتشار طفيلي الزحار الأميبي *Entamoeba histolytica* في بيجي وضواحيها وتأثير مستخلصات قشور الرمان *Punica granatum* في نمو الطفيلي بالوسط الزرعي

الهام عائد أسعد التكريتي و عبد الخالق علوان الجبوري و علي حسين ألطيف التكريتي

قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

(تاريخ الاستلام: ٢٨ / ٥ / 2008 ، تاريخ القبول: ٦ / ٨ / 2008)

الملخص

تضمن البحث جمع 218 عينة براز لمراجعي المختبرات الاهلية في مدينة بيجي والقرى المحيطة بها، وبواقع118 عينة من الذكور و100 عينة من الاناث ولفترة امتدت من(حزيران 2006– شباط2007) للتحري عن انتشار طفيلي الزحار الاميبي *Entamoeba histolytica* ،تم فحص العينات بطريقة الفحص المباشرة ومن ثم بطريقة التركيز باستخدام كبريتات الخارصين .

بينت النتائج إن نسبة الخمج الكلية كانت 61.5% و٧٠.٧ % حيث سجل في الذكور 31.2%و35.8% وفي الإناث 30.3%و34.9%وذلك حسب طريقتي الفحص المباشرة والتركيز على التوالي .كما بينت النتائج إن أعلى نسبة خمج في الفئة العمرية 7-12سنة وكانت 17.4% وان الخمج في الريف 38.1% أعلى مما في المدينة 32.1% وانه في أشهر الصيف 37.6% أعلى مما في أشهر الشتاء34.9% .

وبعد عزل طفيلي الزحار الاميبي وتنميته بنجاح على وسط نقيع الكبد والاكار Liver Infusion Agar ثم دراسة تأثير مستخلصات مائية وكحولية لقشور ثمار الرمان *Punica granatum* وبثلاثة تراكيز على نسبة نمو الطفيلي ،تبين ان نمو الطفيلي يثبط كليا عند تراكيز معينة من المستخلصات النباتية (المائية والكحولية) كما تبين من متابعة تأثير هذه المستخلصات بتركيز IC50 إن لها تأثيرا مثبطا في كمية البروتين والحامض النووي الرايبوزي الـRNA والحامض النووي الدي اوكسي رايبوزي الـDNA .

المقدمة

تسبب الطفيليات عامة والمعوية منها خاصة إمراضاً عديدة للإنسان ويعد طفيلي الزحار الأميبي *Entamoeba histolytica* من الطفيليات وحيدة الخلية Protozoa والتي تسبب عند إصابتها للإنسان ما يعرف بداء الزحار الأميبي Amoebiasis سواءً بظهور الأعراض المرضية أو بدونها [1] والذي يعد من الأمراض الطفيلية المهمة التي قد تسبب للإنسان الموت [2].

أجريت عدة دراسات وبائية في مناطق مختلفة من العالم ، وجد من خلالها أن الإصابة بالزحار الأميبي منتشرة عالمياً وبمعدلات عالية قد تصل إلى أكثر من 50 % في بعض مناطق العالم [3] ويعتمد انتشارها على الظروف البيئية ومدى الاهتمام بالنظافة وتعد المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية من أكثر المناطق ملائمةً لمعيشة الطفيلي حيث تكون ظروفها المناخية ملائمة لديمومة وتطور الطفيلي كالحرارة والرطوبة والتربة الرخوة [4] ، وقد عُرف مرض الزحار الأميبي مرضاً مستوطناً في العراق وبخاصة في الأوساط التي يكون فيها المستوى المعيشي منخفضاً [5] .

أجريت العديد من الدراسات في العراق لمعرفة مدى انتشار طفيلي الزحار الأميبي، فقد أجري مسحاً عن أنشار الطفيليات المعوية في مدينة بغداد [5] وجد فيه أن نسبة طفيلي الزحار الأميبي كانت 23 %بينما سجل آخرون [٦، ٧] نسبة انتشار بلغت 38.4 % و 35.5 % ،أما في الموصل [8] فقد بلغت نسبة انتشاره 20.7 % في حين سجل آخرون [9] نسبة بلغت 26.7 %، وفي اربيل [10] فقد سجلت نسبة إصابة بلغت 18.6 % ، أما في صلاح الدين فقد وصلت نسبة الخمج بهذا الطفيلي إلى24.2 % وذلك في دراسة شملت أقضية المحافظة [١١] أما عند أجراء دراسة عن انتشار مسببات الإسهال الدموي في قضاء بيجي [12] فقد كانت نسبة الخمج39.62 % وكانت هذه النسبة مقاربة لما سجل في مدينة الرمادي [١٣] حيث كانت 35.66 % .هذا بالإضافة لعشرات الدراسات حول انتشار هذا المسبب المرضي على مستوى محافظة صلاح الدين والمحافظات الأخرى .جرت محاولات عديدة لتنمية طفيلي الزحار الأميبي على أوساط زرعية مختلفة لغرض دراسته وكانت أول محاولة تمت بنجاح في عام 1925من قبل Bock & Drbohlay حيث استطاعا تنميته لفترة وجيزة على وسط زرعي ثنائي مكون من جزء صلب وآخر سائل [14] .بعدها توالت التحويرات وحديثاً تناولت دراسات عديدة [١٢، ٩، ١٦، ١٥، ١٣] محاولات لاستنبات هذا الطفيلي على أوساط زرعية مختلفة ومقارنة كفاءة هذه الأوساط لغرض دراسة طفيلي الزحار الأميبي من جوانب عديدة مثل دورة الحياة وتأثير العوامل البيئية المختلفة على حيويته أو معرفة مدى تأثير المستخلصات النباتية والمضادات الحيوية المختلفة عليه وفي أطواره المختلفة(الناشطة والمتكيس). أما في مجال بحوث النباتات الطبية فهناك رأي يقول أن حوالي 70 % من الناس يعتمدون العلاج بالأعشاب الطبية للقضاء على أنواع مختلفة من الإصابات بضمنها الاخماج الطفيلية وبالتحديد الإصابة بالزحار الأميبي [١٧، ١٨] ، وقد استخدمت أعشاب عديدة منها استخدام قشور ولب ثمار الرمان *Punica granatum* فقد استخدم قديماً في الطب والدباغة [18] وقد ثبت بأن قشور الرمان تحتوي على مادة قابضة تستعمل في حالات الإسهال وفُصلت منها بعض القلويدات المهمة التي تستعمل في علاج الإصابة بالديدان الشريطية [17] وأشارت الدراسة ايضاً إلى إن النقيع المائي لقشور الرمان يعمل وبكفاءة عالية على طرد الدودة الوحيدة في الإنسان .تحتوي جميع أجزاء الرمان على التانين Tanine حيث تستخدم كمادة قابضة إضافة إلى العديد من المواد البروتينية والسكرية والمعادن والفسفور والحديد والكبريت والبوتاسيوم [18] كما أن القشور تحتوي على الدهون بنسبة 3.6 % والتانينات 2.6 % وبروتينات 1.2 % [١٩] . في حين أشار آخرون [20] أن لجذور الرمان فعالية ضد طفيلي الزحار الأميبي، بينما وجد في دراسة أخرى[١٢] لمعرفة

تـأثير مجموعـة مـن المستخلصـات النباتيـة علـى هـذا الطفيلـي فـي الوسـط الزرعـي خـارج الجسـم الحـي، أن المستخلصـات الكحوليـة والمائيـة لقشـور الرمان كانت ذات تأثير تثبيطي واضح على حيوية طفيلي الزحار الأميبي وبنسبة 100 %بعد 24 ساعة من المعاملة .يهدف البحث إلى معرفة انتشار طفيلي الزحار الأميبي لما له من آثار مرضية ودراسة بعض الجوانب الوبائية المتعلقة به ومحاولة عزل واستنبات هذا الطفيلي في وسط زرعي مناسب ودراسة تأثير المستخلص المائي والكحولي لقشور ولب ثمار الرمان على حيوية هذا الطفيلي ومعرفة مدى تأثير هذه المستخلصات على بعض الجوانب الكيموحيوية فيه .

المواد وطرائق العمل

أولاً : المسح الميداني

جمع العينات

أخذت عينات البراز من الأشخاص المراجعين للمختبرات الأهلية في قضاء بيجي التابع لمحافظة صلاح الدين وذلك من سكان المدينة والمناطق الريفية حولها للفترة من حزيران 2006 ولغاية شباط 2007 حيث تم جمع 218 عينة براز شملت 118 عينة من الذكور و 100 عينة من الإناث ، سجلت معلومات كاملة عن كل شخص أما بالنسبة للسكن فقد عُدت جميع المناطق التي تتوفر فيها مصادر مياه صحية مناطق مدنية أما تلك التي لا تتوفر فيها هذه المصادر فقد عُدت مناطق ريفية .

فحص العينات

تم فحص العينات التي وضعت في أوعية بلاستيكية نظيفة خلال ساعة من أخذها للتحري عن الأطوار الخضرية Trophozoites والمتكيسة Cysts لطفيلي الزحار الأميبي وتم ذلك بطريقتين :

طريقة المسحة المباشرة مع اليود

وتعد طريقة سهلة وسريعة للكشف عن أنواع الطفيليات المعوية حيث تصطبغ أطوار الطفيلي مما يسهل كشفها وتميزها وتتم بوضع قطرة من محلول اليود اللوكلي مع كمية قليلة من البراز على شريحة نظيفة وتمزج جيداً ثم يوضع غطاء الشريحة وتفحص تحت المجهر عند القوة 10xومن ثم 40x [٢١] .

طريقة التركيز بالتطويف باستخدام محلول كبريتات الخارصين

وهي من الطرق المفضلة للكشف عن أكياس الطفيليات واتبعت الخطوات المعتمدة من قبل العديد من الباحثين السابقين [22 ، 23] .

ثانياً : عزل وتنمية طفيلي الزحار الاميبي

تحضير الوسط الزرعي

استخدم وسط نقيع الكبد مع الاكار Liver Infusion Agar medium وهو وسط ثنائي الطور diphasic [24] يحضر من طور صلب وكما يلي :

* نقيع الكبد مع الاكار Liver Infusion agar 30 gm
* فوسفات ثنائية الصوديوم الهيدروجينية Na_2HPO_4 3 gm
* ماء مقطر disteled water 1000 ml أذيبت المواد في دورق

وسخنت مع التحريك المستمر وصولاً لدرجة الغليان، ثم صبت في أنابيب حجمية وبسعة 6 – 10 مليلتر ، عقمت بالمعقام بدرجة حرارة 121 ^{o} م وضغط 15 باوند ولمدة 20 دقيقة ، وضعت الأنابيب بشكل مائل وتركت ليتجمد الوسط الزراعي على شكل سطح مائل، وضعت بعدها في حاضنة بدرجة 37 مْ لمدة 24ساعة للتأكد من خلو الوسط الزراعي من البكتريا . خزنت فيما بعد بدرجة 4 مْ لحين الاستعمال .

أما الطور السائل والذي وضع فوق الجزء الصلب فهو المحلول الملحي الفسلجي [25] والذي يتكون من:

- فوسفات ثنائية الصوديوم الهيدروجينية Na_2HPO_4 0.95 غم/100مل بحجم 375 مليلتر .
- فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 0.91غم /100 مل بحجم125 مليلتر.
- كلوريد الصوديوم NaCl 0.9 غم/ 100 مل بحجم 2500 مليلتر .

ثبت الرقم الهيدروجيني عند7.2 =pH وعقم بالمعقام بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 15 باوند لمدة 20 دقيقة، ومزج مصل دم الحصان المعقم بنسبة 1 + 6 مليلتر مع المحلول الملحي الفسلجي ومن ثم أضيف7 مليلتر منه إلى كل أنبوبة اختبار حاوية على الوسط الصلب المحضر سابقاً ، ثم أضيف نشا الرز المعقم وبمقدار 0.01 مايكروليتر لكل أنبوبة [26] .

عزل وتنمية طفيلي الزحار الأميبي

تم عزل الطفيلي مباشرة بعد إجراء الفحص المجهري على البراز وظهور الطفيلي وذلك بأخذ كمية قليلة من البراز بواسطة Loop معقم ووضع في الأنبوبة الحاوية على الوسط الزرعي المحضر سابقاً والموضوع في حاضنة بدرجة 37مْ قبل استعماله بنحو ساعة تقريباً ، أضيفت بعد ذلك المضادات الحيوية مثل البنسيلين 1500 – 2000 وحدة والستربتومايسين 3ملغم / مل من الجزء السائل ، كما استخدمت بعض المضادات الحيوية لنمو الفطريات عند الحاجة لذلك مثل النيستاتين وأضيفت بعض الصبغات مثل Acriflavine و Gention violet والتي تثبط نمو الأنواع الأخرى من الطفيليات المعوية [27] . تم مراقبة نمو الطفيلي يومياً وكررت عملية النقل إلى وسط زرعي جديد Subculture مرتين أسبوعياً مع مراعاة التعقيم الجيد وإضافة المضادات الحيوية.حدّد الطور اللوغاريتمي لنمو الطفيلي وجرى تعداد الخلايا فيه خلال فترات المتابعة وتم حساب عدد الأجيال وزمن الجيل الواحد وفق المعادلات الخاصة بذلك.

ثالثاً : تأثير المستخلصات النباتية للرمان

تحضير المستخلصات

حضر المستخلص (المائي والكحولي) لقشور ولب ثمار الرمان بعد تصنيفه على انه *Punica granatum* وذلك بجمع القشور وغسلها جيداً ومن ثم تجفيفها دون تعريضها لأشعة الشمس المباشرة جرى بعد ذلك طحن القشور جيداً ومزج مسحوق القشور مع المذيب (ماء أو كحول) بنسبة 10:1 ووضع على جهاز المحرك المغناطيسي Magnetic stirrer لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة ، فصل بعد ذلك الراشح عن الراسب باستعمال جهاز النبذ المركزي بسرعة 3000دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق ، ركز الراشح باستخدامRotary evaporator وترك بعدها ليجف تماماً بدرجة حرارة المختبر وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال [28] .ولغرض

تحضير التراكيز المطلوبة تم إذابة المستخلص الجاف بكمية قليلة من المذيب ثم خفف بالماء المقطر وحسب التراكيز المطلوبة .

معاملة الطفيلي في الأوساط الزرعية بالمستخلصات النباتية

تم تحضير التراكيز 0.5, 0.75 ,1 ,2.5 ملغم / مليلتر من المستخلص المائي والتراكيز ٠,٥ ، ١ ، ١,٢٥، ٢,٥ ملغم/ مليلتر من المستخلص الكحولي لقشور ولب ثمار الرمان بعد أذابتها بالماء المقطر ومن ثم أضيفت إلى الوسط الزرعي الذي نقل إليه فيما بعد طفيلي الزحار الأميبي بمعدل 2×10^4 خلية / مل واستعملت شريحة تعداد كريات الدم Haemocytometer chamber لتحديد إعداد خلايا الطفيلي [29] ، استعملت ثلاث مكررات لكل تركيز ومن كلا المستخلصين مع مجموعة ضابطة تركت دون أي إضافة للمقارنة.

تقدير فعالية المستخلصات

تم مراقبة نمو طفيلي الزحار الأميبي في الأوساط الزرعية المعاملة بالتراكيز المختلفة مع المجموعة الضابطة بعد 24 , 48 , 72 , 96 ساعة من التحضين بدرجة 37مْ وقد استخدم الفحص المجهري لمسحة محضرة وشخص التأثير من خلال ملاحظة انحلال الناشطات Lyses of trophozoites [30] واعتماداً على ذلك فقد تم تحديد التركيز القاتل لـ 50 % من الطفيليات IC50 كما حدّد التركيز الذي سبب أقل نسبة تثبيط وكذلك التركيز الذي سبب أعلى نسبة تثبيط .

قياس بعض المؤشرات الكيموحيوية

تحضير معلق خلايا الطفيلي

أخذت مجاميع التجربة (الضابطة والمعاملة) بعد انتهاء فترة المتابعة وتم جمع الطفيليات بأخذ السائل الموجود في الوسط الزرعي والحاوي على الطفيلي وتم نبذه مركزياً بسرعة 1000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق ، أهمل الراشح واخذ الراسب الحاوي على الانتميا وغسل عدة مرات بالمحلول الملحي الفسلجي وأعيد نبذه للتخلص من الشوائب العالقة ، عِلق بعد ذلك بالمحلول الملحي الفسلجي بعد إجراء تعداد لخلايا الطفيلي ولكل معاملة .

تحضير المتجانس الخام Crude homogenate للطفيلي

اخذ معلق الانتميا (الضابطة والمعاملة) وتم تحديد عدد الخلايا بحيث يكون بمعدل 2×10^4 خلية /مليلتر وتم تعريضه للترددات فوق الصوتية باستخدام جهاز Ultrasonic لتحطيم الخلايا بالكامل وذلك لثلاث مرات متتالية مع فترة توقف لمنع ارتفاع درجة حرارة المستخلص والذي وضع في حمام ثلجي أثناء التعريض . نبذ المتجانس الخام ، أهمل الراسب Pellete واخذ الراشح Supernatant فقط لقياس بعض المؤشرات الكيوحيوية .

قياس كمية البروتين

استخدمت طريقة لاوري Lowry *et al* 1951 والمعتمدة على استخدام كاشف فولن لتقدير كمية البروتين الكلية في المستخلص الخام لطفيلي الزحار الأميبي بالنسبة للمجموعة الضابطة والمجاميع العاملة ، وتم حساب كمية البروتين بالاعتماد على المنحنى القياسي للبروتين .

استخلاص الأحماض النووية الكلية

تم إجراء عملية الاستخلاص للأحماض النووية الكلية وفق الطرق المعتمدة [31] وذلك لحساب كمية هذه الأحماض في المستخلص الخام .

تقدير كمية الحامض النووي RNA

وتعتمد على استخدام كاشف الاورسينول Orcinol reagent ومن ثم حساب القيم الناتجة اعتماداً على المنحنى القياسي لـ RNA .

تقدير كمية الحامض النووي DNA

وتعتمد على ا ستخدم كاشف الداي فينايل امين Diphenyleamine reagent ومن ثم حساب القيم الناتجة بالاعتماد على المنحنى القياسي لـ DNA .

النتائج والمناقشة

تم جمع 218 عينة من براز الأشخاص المراجعين للمختبرات الأهلية في مدينة بيجي والقرى المحيطة بها للتحري عن انتشار طفيلي الزحار الأميبي حيث تم فحصها بطريقة الفحص المباشرة والمصبوغة بصبغة اليود ومن ثم فحصت بطريقة التركيز باستخدام طريقة التطويف بكبريتات الخارصين .

يبين جدول(1) الأعداد المفحوصة موزعة حسب الجنس(ذكوراً وإناثاً) وكذلك حسب طريقة الفحص المستخدمة ، ويلاحظ أن النسبة الكلية للخمج بطفيلي الزحار الاميبي عند الفحص بالطريقة المباشرة كانت61.5 % بينما كانت 70.6 % عند فحص العينات بطريقة التركيز ، ونجد أن الطريقة الثانية كانت أجدى في التحري عن أطوار الطفيلي (الناشطة والمتكيس)، حيث احتمالية فحص كميات اكبر من العينة المأخوذة مما يمكن من العثور على الأكياس حتى ولو كانت نسبة الإصابة قليلة جدا"، مقارنة بالكمية المفحوصة بالطريقة الأولى والتي تكون قليلة جدا" ويتم فيها العثور على الأطوار في حالات الإصابة الشديدة ، وهذا يوافق نتائج آخرين [١١، ١٢، ١٣] . أن نسبة الخمج الكلي والتي حصلنا عليها هي عالية مقارنة بنتائج أخرى [١٢] والتي أجريت في نفس المدينة وبفترة زمنية مقاربة إذ بلغت 39.62 %، وقد يعود ذلك إلى أن الدراسة أعلاه شملت عينات لمرضى مصابين بألاسهال فقط بينما كانت عيناتنا عشوائية وشملت أيضاً أشخاصاً لا يعانون أي أعراض مرضية مما يدل على الانتشار الواسع لهذا الطفيلي في أشخاص قد يعتبرون حاملين لهذا الطفيلي حتى لو لم تظهر عليهم أي أعراض [4] ، وهناك نسب متفاوتة مع ما سجل لدينا ففي مدينة تكريت [32] سجلت إصابة بنسبة 48.8 % وفي كركوك [33] سجلت إصابة بنسبة 42.5 %أما في بغداد [7] فقد كانت نسبة الخمج 44.6 % بينما هناك دراسات سجلت ما لا يزيد عن 20.4 % كنسبة إصابة بطفيلي الزحار الأميبي وذلك في محافظتي صلاح الدين والبصرة [١١، ٣٤] . يلاحظ أيضا أن نسبة الخمج في الذكور والإناث كانت متقاربة وبدون فروقات معنوية حيث كانت 31.2 % و35.8% للذكور و30.3 % و 34.9 % للإناث حسب طريقتي الفحص المباشرة والتركيز بالتوالي .ويوافق هذا ما توصل إليه أخرون [٥، ٣٥، ٣٦] وقد يعود السبب إلى تماثل الظروف الملوثة والتي يتعرض لها كلا الجنسين ، في حين أظهرت دراسات أخرى وجود فروقات معنوية بين نسبة الخمج في الذكور والإناث [١٣، ٣٧] . يوضح جدول(2) توزيع الخمج باميبيا الزحار حسب الفئات العمرية ولكلا الجنسين ، ويلاحظ أن أعلى نسبة كانت في الفئة العمرية 7-12 سنة وبلغت 17.4 %بينما كانت الفئة25 سنة فما فوق هي الأقل10.1 % مع أن التحليل الإحصائي لم يظهر فروقات معنوية واضحة ،بين المجموعتين . وهذا مشابه لنتائج أخرين [١٢، ١٣] ألا انه جاء مخالفاً لنتائج دراسة أخرى [32] حيث كانت الفئة العمرية الصغيرة 6 - 12 شهراً

هي الأكثر عرضة للخمج بهذا الطفيلي بينما وجد في دراسة أخرى [38] أن الفئة 16 - 30 سنة هي الأكثر خمجاً ، وقد يعود هذا إلى طبيعة الفئة 7 - 12 سنة من عدم الدراية الكافية بشروط النظافة الشخصية أو أنهم بعمر الدراسة الابتدائية ومعرضين للاختلاط أو قد يلجأون إلى تناول أغذية غير صحية خارج المنزل [4] .لم تظهر فروقات واضحة في نسبة الخمج بين المدينة والريف32.6% و 38.1 % وكما يوضحها الجدول(3) وعلى الرغم من تفوق نسبة خمج الريف وهذا يعلله تداخل الحياة بين الريف والمدينة مع انخفاض المستوى الاجتماعي وقلة توفر نظم الصرف الصحي واستهلاك ماء الشرب غير المعقم وكثرة الحشرات الناقلة للطفيلي في الريف نظراً لكثرة البساتين، وأظهر الذكور في الريف نسبة إصابة أعلى ٢٠,٢ % و ١٥,٦% مقارنة بذكور المدينة، وقد يعود السبب في ذلك إلى طبيعة عملهم بالزراعة وتلامسهم المباشر مع التربة والحيوانات الناقلة للطفيلي، وهو مشابه لما تم التوصل إليه في بغداد [5] وفي واسط [39] وكذلك في كربلاء [36] .أما عند مقارنة نسبة الخمج حسب الأشهر الحارة والباردة كما يوضحها الجدول (4) فقد كانت مرتفعة في أشهر الصيف و بكلا طريقتي الفحص إذ بلغت36.7% , 37.6 % أما في أشهر الشتاء فقد بلغت 24.8% و 33 % بالطريقة المباشرة والتركيز، على التوالي .وهناك دراسات أخرى مشابهة، ففي مدينة الرمادي [13] اثبت أن الإصابة ارتفعت في أشهر الربيع والصيف إذ بلغت 40.95 % بينما انخفضت خلال الخريف والشتاء27.29 %. كما إن نتائج الدراسة تطابق ما تم التوصل إليه في دراسة في محافظة الانبار

جدول (١) الأعداد المفحوصة والأعداد المصابة بطفيل *Entamoeba histolytica* _ بالنسبة للذكور والإناث وحسب طريقتي الفحص .

توزيع العينات طريقة الفحص		للعدد الكلي المفحوص		العينات المصابة		المجموع
		ذكور	إناث	ذكور	إناث	
الطريقة المباشرة	ع	118	100	68	66	134
	%	54.1	45.9	31.2	30.3	61.5
طريقة التركيز	ع	118	100	78	76	154
	%	54.1	45.9	35.8	34.9	70.7
المجموع	٢١٨					

جدول (٢) توزيع الاصابة بـ *Entamoeba histolytica* حسب الفئات العمرية لكلا الجنسين

الفئات العمرية (سنة)		العينات المصابة		المجموع
		ذكور	إناث	
١-٦	ع	17	18	35
	%	7.8	8.3	16.1
٧-١٢	ع	18	20	38
	%	8.3	9.2	17.5
١٣-١٨	ع	15	20	35
	%	6.9	9.2	16.1
١٩-٢٤	ع	16	8	24
	%	7.3	3.7	11.1
٢٥ فما فوق	ع	12	10	22
	%	5.5	4.6	10.1
المجموع	ع	78	76	154
	%	35.8	34.9	70.7

جدول رقم (٣) توزيع الاصابة بـ *Entamoeba histolytica* بين المدينة والريف موزعة حسب الجنس ولكلا طريقتي الفحص

طريقة الفحص المنطقة		الطريقة المباشرة		طريقة التركيز	
		ذكور	اناث	ذكور	إناث
المدينة	ع	٢٥	٣١	٣٤	٣٧
	%	١١,٥	١٤,٢	١٥,٦	١٧,٠
	مج	٥٦		٧١	
	%	٢٥,٧		٣٢,٦	
الريف	ع	٤٣	٣٥	٤٤	٣٩
	%	١٩,٧	١٦,١	٢٠,٢	١٧,٩
	مج	٧٨		٨٣	
	%	٣٥,٨		٣٨,١	
المجموع الكلي	ع	٦٨	٦٦	٧٨	٧٦
	%	٣١,٢	٣٠,٣	٣٥,٨	٣٤,٩

جدول رقم (٤) توزيع الاصابة بـ *Entamoeba histolytica* موزعة حسب أشهر الصيف وأشهر الشتاء ولكلا طريقتي الفحص

طريقة الفحص الموسم		الطريقة المباشرة		طريقة التركيز	
		ذكور	إناث	ذكور	إناث
أشهر الصيف (الحارة)	ع	٣٨	٤٢	٤٠	٤٢
	%	١٧,٤	١٩,٣	١٨,٣	١٩,٣
	مج	٨٠		٨٢	
	%	٣٦,٧		٣٧,٦	
أشهر الشتاء (الباردة)	ع	٣٠	٢٤	٣٨	٣٤
	%	١٣,٨	١١,٠	١٧,٤	١٥,٦
	مج	٥٤		٧٢	
	%	٢٤,٨		٣٣,٠	
المجموع الكلي	ع	٦٨	٦٦	٧٨	٧٦
	%	٣١,٢	٣٠,٣	٣٥,٨	٣٤,٩

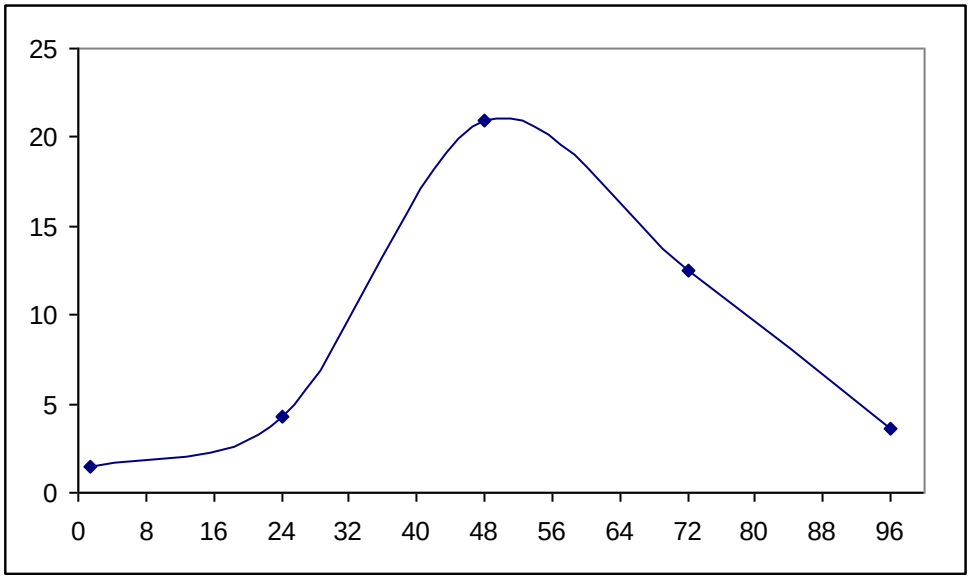
وأيضا يطابق نتائج في محافظة الانبار [40] وأخرى في كركوك [33] لكنه جاء مخالفاً لنتائج باحثين آخرين [١٢، ٣٢] في تكريت وبيجي حيث وجد أن نسبة الإصابة ارتفعت في أشهر الشتاء وانخفضت في أشهر الصيف . ويذكر أن الإصابة تكون أكثر حدوثاً في الطقس الرطب من الطقس الجاف [41] كما أنها تكثر في الجو الدافئ أكثر من الجو البارد لذا تكثر في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية [23] ، كما يعزى ارتفاع نسبة الخمج في الصيف إلى زيادة فعالية السكان وفرص تعرضهم للمصادر الملوثة في هذا الموسم.

حدّد الطور اللوغاريتمي لنمو طفيلي *E. histolytica* في وسط نقيع الكبد مع الآكار Liver Infusion Agar medium ، حيث تم تحضير الأوساط الزرعية ثم لقحت بالطفيلي وبمعدل 2X 10٤ خلية / مل وحضنت

بدرجة حرارة ٣٧ مْ وتم حساب عدد الطفيليات يوميا" باستخدام شريحة تعداد كريات الدم Haemocytometer، وتوضح النتائج في جدول (5) وشكل (1) والذي يمثل منحنى النمو لطفيلي الزحار الأميبي إن عدد الانتميا بداء بالزيادة الخطية بعد مرور 24 , 48 ساعة ثم انعدمت الزيادة بعد مرور 72 , 96 ساعة . ومنها يتبين أن 48 ساعة هي الطور اللوغاريتمي للطفيلي وفيه يكون عدد الأجيال 18.9 ± 0.14 وزمن الجيل هو 2.5 ±1.09 ، ويركز الاهتمام على تحديد الطور اللوغاريتمي لأنه يعد من أهم الأطوار التي يمر بها الطفيلي خلال مدة نموه إذ تكون فيه جميع الخلايا حية وذات حجم ثابت تقريباً [42] .أما جدول (6) فيبين نسبة نمو طفيلي الزحار الاميبي في الوسط الزرعي باستخدام تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي لقشور ولب ثمار الرمان وفيه يلاحظ أن المستخلص المائي وبتركيز 1.0 ملغم / مل وعند الزمن 96 ساعة كان الأسرع في إحداث التثبيط الكامل 100% لنمو الطفيلي مقارنة بالمجموعة الضابطة ، ويخالف هذا ما توصل إليه الناصري [12] عند استخدامه لنفس المستخلص وبنفس التركيز لكنه حصل على تثبيط 100% بعد 24 ساعة فقط ، أما بالنسبة للمستخلص الكحولي فقد كان أكبر تثبيط له 100%عند التركيز 2.5 ملغم / مل وعند 72ساعة مخالفاً بذلك للنتائج التي توصل إليها الباحث أعلاه حيث وجدوا أن المستخلص الكحولي .

جدول (5) عدد الخلايا (10^4 X) لطفيلي الزحار الاميبي *Entamoeba histolytica* النامية على وسط Liver Infusion Agarوعدد الأجيال وزمن الجيل بالساعات ولفترات زمنية مختلفة .

الفترة (ساعة)	عدد الناشطات 10^4 X المعدل±الخطأ القياسي	عدد الأجيال المعدل ±الخطأ القياسي	زمن الجيل (ساعة) المعدل ± الخطأ القياسي
24	0.30±4.3	٠,٢±٩,١	٢,١±٢,٦
48	٠,٥٤±٢٠,٩	٠,١٤±١٨,٩	١,٠٩±٢,٥
72	٠,٣٠±١٢,٥	٠,٥±١٥,٩	0.34±4.5
96	٠,٢٥±٣,٦	٠,٣±٧,٩	٣,٧±١٢,٢



شكل (1) منحنى النمو الطفيلي *Entamoeba histolytica* في وسط Liver Infusion Agar

جدول (6) نسبة نمو طفيلي الزحار الاميبي *Entamoeba histolytica* في وسط Liver Infusion Agar وباستخدام تراكيز مختلفة من مستخلصات قشور ولب ثمار الرمان *Punica granatum*

نوع	التراكيز (ملغم / مل)		
	0.5	1.0	2.5

المعاملة		الفترة الزمنية للتعريض (ساعة)											
		24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
المستخلص المائي	للنمو%	97	83	79.1	40.5	83.2	60.4	20.2	0.0	73.2	0.0	0.0	0.0
	للتثبيط%	3	17	20.9	59.5	16.8	39.6	79.8	100	26.8	100	100	100
المستخلص الكحولي	للنمو%	84.6	18.6	72.3	20.5	76.2	76.0	31.4	5.9	43.4	15.2	0.0	0.0
	للتثبيط%	15.4	18.2	27.7	79.5	23.8	24.0	68.6	94.1	56.6	84.8	100	100
control* الضابطة		٤٣	٢٠٩	١٢٥	٣٦	٤٣	٢٠٩	١٢٥	٣٦	٤٣	٢٠٩	١٢٥	٣٦

* الارقام تمثل اعداد خلايا الطفيلي النامية × $١٠^{٣}$

للرمان احدث تثبيطاً 100 % عند التركيز 0.75 % وبعد 24 ساعة فقط [12] على الرغم من وجود دراسات عديدة تشير إلى أن المستخلص المائي هو الأكثر فعالية ضد كائنات عديدة [19] والتي بينت أن المستخلص المائي لقشور الرمان له فعالية عالية في تثبيط البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كَرام مثل *Pseudomonas spp* , *staphylococcus aureus* فضلاً عن تأثيره الفعال ضد بعض أنواع الفطريات الجلدية وأنواع عديدة من فطر *Aspergillus spp.*، وعلى العموم فأن لمستخلصات قشور الرمان سواءً كانت مائية أو كحولية تأثيراً واضحاً على أو إلى طفيلية عديدة منها طفيلي البويغات الخبئية *Cryptosporidium parvum* حيث بلغت كفاءته في دراسات اخرى 75 % و 53 % [44, 43] ، كما ان له تأثيراً واضحاً على نمو طفيلي المشعرة المهبلية *Trichomonas vaginalis* عند استخدامه بالتراكيز 0.75 % ,1% بعد 24 ساعة من المعاملة [45] .وقد تعود فعالية مستخلصات قشور الرمان إلى احتوائها على مادة التانين والقلويدات والعفصات وهي من المواد الفعالة في طرد الطفيليات المعوية المختلفة [46] .تم تحديد التركيز القاتل لـ 50 % من طفيلي الزحار الأميبي النامي في الوسط الزرعي ولكلا المستخلصين، وكان IC_{50} للمستخلص المائي هو 0.75ملغم / مل و 1.25ملغم / مل بالنسبة للمستخلص الكحولي ، وتم اعتماد هذه التراكيز باعتبارها IC_{50}المعاملة الطفيلي ومن ثم قياس كمية البروتين الكلي والأحماض النووية بنوعيها الرايبوزي RNA والديوكسي رايبوزي DNA لمعرفة مدى تأثرها بالمستخلصات المستعملة . توضح النتائج في جدول (7) إن للمستخلص المائي تأثيراً واضحاً على كمية البروتين الكلية في طفيلي الزحار الأميبي حيث انخفضت الكمية وبنسبة تثبيط بلغت39.1 % أما المستخلص الكحولي فقد كانت نسبة تثبيطه 28.29 % مقارنة بالمجموعة الضابطة .

جدول (7) تأثير تركيز IC_{50} (ملغم / مل) لمستخلصات قشور ولب ثمار الرمان *Punica granatum* على كمية البروتين الكلية (مايكرو غرام / مل) في طفيلي *Entamoeba histolytic*a النامي في وسط Liver Infusion Agar

المعاملة	تركيز IC_{50}	كمية البروتين الكلي (مايكروغرام/مل) المعدل ± الانحراف القياسي	% للتركيز	% للتثبيط
Control الضابطة	–	562.3 ± 2.8	100	0.0
المستخلص المائي	0.75	342.5 ± 0.06	60.9	39.1
المستخلص الكحولي	1.25	403.2 ± 0.2	71.71	28.29

الرقم يمثل المعدل لثلاث مكررات ± الانحراف القياسي

وقد يعود هذا الانخفاض في كمية البروتين إلى تداخل بعض المواد الفعالة الموجودة في مستخلصات قشور ولب ثمار الرمان مع عملية صنع البروتين أما من خلال ارتباطها مع الرايبوسومات المنتشرة في السايتوبلازم أو مع الأنزيمات التي تشترك في صنع الأحماض الأمينية التي يتكون منها البروتين [15] .أما جدول (8) فيبين تأثير التركيز القاتل IC_{50} للمستخلصات على الكمية الكلية للأحماض النووية وكمية RNA و DNA ، كل على حدى وهي من المكونات المهمة في الخلية الحية والتي تكون هدفاً مهماً في عمل الأدوية ، وجد أن المستخلص المائي أدى إلى حدوث تثبيط في الكمية الكلية للأحماض النووية بنسبة 41.28 % وتثبيط بنسبة 44 %و 35.29 % في كل من RNA و DNA ، على التوالي ، أما المستخلص الكحولي فقد كان تأثيره اقل من ذلك حيث أدى إلى تثبيط بنسبة 33.9% في الكمية الكلية للأحماض النووية بينما كان تثبيطه بنسبة 40% و 20.59 % لكل من RNA و DNA على التوالي . وقد يعود السبب في ذلك إلى تأثير بعض المركبات الفعالة الموجودة في مستخلصات الرمان على تركيب الأحماض النووية أو أنها قد تؤثر على الأنزيمات المساعدة في عملية تصنيعها [47] ، وتحتوي مستخلصات قشور الرمان مركبات قلويدية فعالة وقد وجد إن لبعض المركبات المعزولة من نباتات مختلفة القدرة على تثبيط الحامض النووي DNA عن طريق التفاعل المباشر معه أو إنها قد تثبط الحامض النووي RNA و DNAعن طريق تثبيط إنزيمات Polymerse الخاصة بها أو إنها قد تثبط الأحماض النووية من مصادرها الأولية والتي تشمل النيوكليوتيدات الرايبوزية والديوكسي رايبوزية [48 , 15 , 49] .

جدول (8) تأثير تركيز IC_{50} (ملغم/مل) لمستخلصات قشور ولب ثمار الرمان *Punica granatum* على كمية الأحماض النووية الكلية (مايكروغرام / مل) لطفيلي الزحار الأميبي *Entamoeba histolytica* النامي في وسط Liver Infusion Agar

المعاملة	تركيز IC_{50} ملغم/مل	التركيز الكلي للأحماض النووية (مايكروغرام/مل) المعدل±الانحراف القياسي	% للتركيز	% للتثبيط	كمية RNA (مايكروغرام/مل) المعدل±الانحراف القياسي	% للتركيز	% للتثبيط	كمية DNA (مايكروغرام/مل) المعدل±الانحراف القياسي	% للتركيز	% للتثبيط
Control الضابطة	–	٠,٦ ±١٠٩	100	–	0.2 ± 75	100	–	1.5 ± 34	100	–
المستخلص المائي	0.75	1.8 ± 64	58.72	41.28	2.1± 42	56	44	2.4 ± 22	64.71	35.29
المستخلص الكحولي	1.25	٢,٨ ± ٧٢	66.1	33.9	3.8 ± 45	60	40	3.2 ± 27	79.41	20.59

المصادر

1- Green Wood, D. (1997). Protozoa In Medical Microbiology 15thed . Churchill _ Living stone P . 580 – 582.

2 - Mbaye, P. S; koffi. N; Camara, P; Burge, P. R.; Hovette, P. & klotz, F. (1998). Rev. Pneumol. Clin. 54 (6) : 346 _ 352. (Abs. Medline).

3 - Plorde, J. J. (1983). Amebiasis In: Harrison ٥s Principles of Internal Medicine By: Petersdorf ; Adamsi Braun wald; Isselbacher, Martin and Wilson. 10thed .schwabe and company. Ltd . German P : 1182 _ 1186 .

4- Belding, D. L. (1965). The parasitic Amebae of Man In : textbook of parasitology. 3 rd ed .Appleton – Century crofts , Newyork . USA .

5- AL_Jeboori , T. I. & Shafiq, M. W. (1976). J. Fac. Med . Baghdad. 18: 161 – 170.

٦- إبراهيم، تمارا خليل (1997). رسالة ماجستير كلية التربية (ابن الهيثم). جامعة بغداد.

٧- الجنابي، فرح عبد الكريم ناصر،(2002). رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية

8- AL_Hanoon, Z.A.& Mukhlis, S (1982).J. Fac. Med . Baghdad. 24 (4) : 225 – 230 .

9- Abbassa, E.T.B.T (2004). M.S. Master thesis, college of Medicine. University of Mosule .

10- Molan. A. L. & Farag. A. M. (1989). Saudi. Med . J . 10 (2) : 107 .

١١- التكريتي، الهام عائد اسعد (1997). رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات. جامعة تكريت.

١٢- الناصري، مبدر عواد عبد اسعد، (2007). رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة تكريت .

١٣- الدليمي، خديجة خليف عبد الله ، (2001). رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الانبار.

14- Boeck, W. C.& Drbohlay, J. (1925). Am. J. Hyg. 5 : 371 – 407.

15- Hall, L. H; Tagahave, K. & Lee, K. H. (1982). J. Farmacent. Sci. 71 (7): 741 _ 744 .

16- Barwari, W. J. D. (2006).Ph. D. thesis college of Medicine, University of Mosul .

١٧- حسين، فوزي طه قطب، (1979) . النباتات الطبية وزراعتها ومكوناتها. الدار العربية للكتب، تونس .

١٨- زمزم، حمدي، (1985). عجائب الطب العشبي في التغذية . دار الهجرة للطباعة والنشر والتوزيع. دار الايمان، بيروت.

١٩- باقر، ميعاد غالب، (1997). رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة البصرة .

20 - Segura, J. J.; Morales, R. L. H.; Verde, S. J. & Guerra, D. (1990). Arch. Invest. Med. Mex. 21 (3): 235 _ 239.

21 - Lumsden, W, H; Burns, S, & Mc Millan. A. (1996). Protozoa In Practical Medical Microbiology. By: llec, J. G.; Marmion, B. P;

22- Faust, E. C; Sawitz, T. J; Odon, U.; Pres, C. XLincicome , R. (1939) J. Parasit. 25, (3) : 241.

23- Boeck, H. W. & Neva, F. A. (1983). Basic clinical parasitology. 5 th ed , Appleto _ Century _ Crofts . Norwalk. Connecticut , London. P. 23 – 40 .

24- Cleveland, L. R. & Collier. J. (1930) .Amer. J. Hyg . 12: 606- 614

25- Difco. M. (1953). Microbiology and clinical Laboratories. USA. P 97-99

26- Gleason, N. N; Goldman, M; Carver, R. K. (1960) . An enri - ched. egg extract medium For recovery Viable *Entamoeba histolytica* trophozoite from faecal suspend sions Kept at room temperature for four days bid. Hyg. 9: 46- 49.

27 - Ridiey, D. S.; Hewgood, B. C. (1956). J. Clim. Path. 9: 74 _ 76.

٢٨- الخزاعي، زيادة متعب سلطان، (2001).رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة القادسية.

29- Cedeno, J. R. & Krogstad D. J. (1983). J. Infect. Dis. 148 (6): 1090 - 5.

30 -Spice. W. M. & Ackers, J. P. (1990). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84 : 693 _ 694 .

31 - Shneider, W, C. (1957). Determination of nucleic acid in tissues by pentose analysis in ((Methods in Enzymology)). vol. 111, Academic Press, New York.

٣٢- الجبوري، هدى صالح. (2001). رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة تكريت.

33- Ismail, A. K. M. (2006).Ph.D. thesis, College of Medicine, University of Tikrit.
34 -Mahdi, N. K; AL _ Sadoon, I. & Mohamed, A. J. (1996). Eastern Medit Hlth. J. 2 (1) : 115 _ 120.
٣٥- العبيدي، رافد عصام حسين. (1998). رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد .
36- AL_ Dujaili (1993) Diploma thesis. University of Saddam. Baghdad .
٣٧- العمر، نجاح صبحي.(1992).رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.
38- Abdel _ Hafez. M.M.A; EL_ kady. N.; & Baknina, M.H.(1986). Ann. Trop. Med. parasit. 80 (6): 631 – 634.
39- AL_ Najjar. R. K. (1993).Diploma thesis. University of Saddam. Baghdad
40- AL_ Dulaimi, S.S (1996). ALMustansiriya. J.SCI.7: 64 _ 68
41- Bray. R. S.& Harris. W. G. (1977). Trans. Roy .Soc. Trop. Med. Hyg. 71 (5) : 401 – 406 .
42 - Prescott, L. M.; Harley. T. P. & Klein D. A (1996). Microbiology. 3rded. Wm. C. Brown Publisher. London. Chicago.
43- AL _ ALousi , T. I. (2004). Ph.D. thesis. College of Medicine. University of Tikrit.
٤٤- الرفاعي، عهود مزاحم شاكر. (2006). رسالة ماجستير، كلية التربية للبنات، جامعة تكريت.
٤٥- الصميدعي، انتصار غانم عبد الوهاب. (2006). رسالة ماجستير ، كلية التربية للبنات ، جامعة تكريت .
46- Hoffmann, D. (1996). The Complete illustrated holistic herbal, a safe practical guide for making and using herbal remedies lement book. Great Britain. P. 132.
47 - Katzung. B. C. (1989). Chemotherapeutics Drugs. In Basic and clinical Pharmacology. 4thed. Prentice, _ Hall International Inc.
48 - Marr, W; Tan ,G. T; Gro dell, G. A. & Pezzuto, J. M. (1991) . J . Nat . Prod . 54 (6): 1531 _ 1542 .
49 - Hunter. T. & Cooper, J. A. (1980). In ((Enzymes)) By. P.O. Boyer & E.G. Kerbi, Academic Press, Orlando .

Prevelance of *Entamoeba histolytica* in Baiji province and the effect of *Punica granatum* rind extract on the parasite in culture

Ilham Ayed Asaad Al -Tikrity , Abdul_khaliq Alwan , Al-Jubory Ali Hussain Altaif Al- Tikrity
Department of Biology , College of Education , Univirsity of Tikrit , Tikrit , Iraq
(Received 28 / 5 / 2008 , Accepted 6 / 8 / 2008)

Abstract
The prevalence of *Entamoeba histolytica* in Baiji area and the effect of *Punica granatum* rind extract on the parasite growth were studied .Stool samples collected from(118)males and(100)females during June2006-Feb.2007, at Baiji private clinical labs,were examined for *E. histolytica* using both direct examination and concentration (by zinc sulphate) methods.
According to these two methods ,it was found that the total percentage of infection was 61.2% & 70.7% respectively, while in males was 31.2%&35.8% and in females was 30.3% & 34.9%. In children 7-12 years the highest percentage of infection was 17.4% ,it was found also that infection was higher in villages 38.1% than in the city 32.1% and in summer 37.6% than in winter 34.9%.
After isolation and successful growing of *E. histolytica* on Liver Infusion Agar, the effect of different concentrations of aqueous and alcoholic plant extracts of *Punica granatum* on the parasite was tested .It was found that at certain concentrations of these extracts the parasite was completely inhibited.The tested extracts at IC_{50} were found to cause a clear reduction in protein, RNA and DNA of the parasite.