التحري عن فيروس الروتا في عينات مياه المضخات والمياه الراكدة والضخ الرئيسي في محافظة بابل

امال راقب شمران

كلية العلوم للبنات /جامعة بابل

amalalkhafaji860@yahoo.com

الملخص

يعد فيروس الروتا من اهم المسببات المرضية لالتهاب الامعاء الحاد في الاطفال في كل انحاء العالم حيث ينتشر بسرعه وبقوة من الجسم الى مختلف مصادر المياه في البيئة مما يشكل خطرا بيئيا على صحه الانسان ربما يعود ذلك الى ثبوتية الفايروسات في المياه وثبوتيته اثناء معالجة المياه. خلال الدراسة تم فحص4 لتر من مياه مضخات الشرب والمياه الراكده (الخزانات)ومياه الضخ الرئيسي بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل polymerase Chain Reaction (PCR) حيث كانت 30% من المصادر موجبة لفحص فيروس الروتا ، 7% من اسطوانات مضخات مياه الشرب كانت حاوية على فيروس الروتا و 10 % في مياه الخزانات الراكده،اما مياه الضخ الرئيسية (الاسالة) فكانت النسبة 13% .

Detection of Rota virus in pumps water, tanks water and tab water samples in Babylon province

AMAL RAQIB SHAMRAN

Bbylon university /college of Science for women

Abstract

Rotavirus is the main reason of acute gastroenteritis infections in children worldwide, it spread so fast and strong from the body to different sours of water in the environment which it will be hazard to human health ,and that might be return to virus stability duing water treatment.4 liter of pupms water, tanks water and tab wate were tested for rotavirus: 30% for the sources have positive results in all samples ,where 7% of pupms water ,10% of tanks water, and 13% of tab water contained rotavirus.

المقدمة:

يعد التهاب الامعاء من الامراض الشائعة التي تصيب الاطفال بعمر اقل من خمس سنوات وبالاخص الرضع ،اذ يصيب مايقارب (8-5) مليون طفل سنويا وفي بعض الحالات يؤدي الى الوفاة، يتميز هذا المرض بالتهاب القناة الهضمية (Gastroenteritis) التي تشمل كلا من المعدة (gasto) والامعاء الدقيقة (entero) اما المقطع (it is) فانه يشير الى الالتهاب ،ومن اعراضه التقيؤ ، الاسهال ، الم البطن وتشنج اما العوامل المسببة للمرض فانها متعددة منها الاصابة بالفيروسات ، البكتريا والطفيليات (الجبوري،حوراء جواد 2013) .

على الرغم من تواجد وتوفر المصادر المائية المعقمة والنظيفة الا انه يوجد الكثيرين من الاشخاص الذين يعتمدون على مصادر غير موثوقة او معقمة من مياه الشرب للتناول والاستهلاك ممايقود الى حدوث حالات اصابات فيروسية وحالات تسمم معويه حاده وخاصة بين الاطفال وذوي النقص المناعي.(Balk,D.,T Pullum , A.Storeygard,2oo5).

ان الكثير من الامراض مثل الاسهال والالتهاب المعوي والالتهابات التنفسية وامراض التهاب الكبد الفيروسي تكون دائما مترافقة مع الفيروسات والتي تكون دائما مترافقة مع الفيروسات والتي تكون ملوثة لاغلب المصادر المائية ،تكون الوحدات الفيروسية قليلة جدا او نادرة في العينات البيئية الطبيعية لانه من الصعب عليه التكاثر في الطبيعه بدون وجود مضيف حيوي ،يعد فيروس الروتا من اهم الفيروسات الواسعة الانتشار في العالم والتي تنتقل بمصادر مختلفة مثل التربة وعينات براز المصابين بالاسهال وكذلك ايدي العاملين في منظومات تصفية المياه والعاملين في المصادر الضخ الرئيسية (Vonsover A, Shif I, Silberstein 1993)

ذكرت الدراسات ان الالتهابات المعوية تكون مترافقة مع المياه وخاصة الاصابات الفيروسية حيث وصلت نسبتها في شمال امريكا الى حوالي 15-30% لكونها اكثر مقاومة للظروف الطبيعية من البكتريا ، وجد بان الانواع العديدة من فيروس الروتا تتسبب في امراض معدية عديدة للانسان مثل الاسهال والتهاب القرنية والاصابات التنفسية بالاضافة الى ان الاسهال الحاد عند الاطفال الذين يعانون من نقص المناعه هو بسبب فيروس الروتا .(Payment ,P.,A,Berte,1997)

المواد وطرائق العمل

جمعت 100 عينة ماء خلال سنة 2015 من مناطق مختلفة من محافظة بابل من المركز(45)عينة ومن النواحي والاقضية(55)عينة موزعة بين بعض مناطق مركز المحافظة (نادر 1،نادر 2 ،نادر 3، شارع 40، شارع 80، شارع 60،سوق المدينة الكبير)وبعض النواحي (ناحية القاسم، ناحية الحمزة ،ابي غرق ، المسيب) 35 عينة ماء مضخات و35 عينة ماء راكد(خزانات)و 30 عينه ماء ضخ رئيسي (اسالة) واستغرقت فتره الجمع شهري اب وايلول لسنة 2015، حيث نقلت الى المختبر واجري عليها عمليات استخلاص الحامض النووي الرايبوزي RNA بواسطة عدة الكت الخاص بشركة (invetrogen) وبعدها تم تحويله الى DNA بواسطة انزيم cDNA بعدها ومن ثم تم تحديد النوع الوراثي (P) استخدام بوادئ متخصصة بتقنية Polymerase Chain PCR Reaction . بجهاز veriti 96 thermocycler وتتضمن هذه الخطوة مرحلتين هما :

المرحلة الاولى:: تتضمن تحويل الرنا (RNA) الى الدنا المتمم (cDNA) بوجود البوادئ (Rcon2) (Fcon 3) وضعت في انابيب الجهاز (PCR) وبرمج الجهاز على النحو الاتي :

جدول (1) عدد الدورات لجهاز الثرموسايكلر لتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتحويل الرنا (RNA) الفيروسي الى الدنا المتمم (cDNA)

عدد الدورات		درجة الحرارة	الزمن اللازم
دورة واحدة	تفاعل الاستنساخ العكسي Revers transcriptase reaction	45 م	30 دقيقة
	تحطيم الرنا وتصنيع الدنا المتمم	94 م	5 دقيقة
	المسخ Denaturation	94 م	30 دقيقة
30 دورة	اعادة الارتباط (annealing)	(42-68)م	30 ثانية
	الاستطالة (extension))	72م	50 ثانية
دورة واحده	التمديد النهائي (final extension)	72م	7دقيقة
دورة واحده	خفض درجة الحرارة	4م	

المرحلة الثانية :

تم خلط (5) مايكروليتر من ناتج المرحلة الاولى ووضع في انبوبة حاوية على (master mix) مع 1 مايكروليتر من بادئ con3 بتركيز 20 مايكرومولار مع 1 مايكروليتر من بادئ (1T-1) بتركيز 10 مايكرومولار،اخذ5 مايكروليتر من الخليط واضيف الى انبوبه ابندروف الخاصة بجاز ال PCR وتمت برمجة الجهاز على النحو التالي :

جدول (2) عدد الدورات لجهاز الثرموسايكلر لتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لبلمرة وتكثير cDNAالخاص بالفيروس

عدد الدورات		درجةالحرارة	الزمن اللازم
30 دورة	المسخ Denaturation	94 م	0.5 دقيقة
	اعادة الارتباط (annealing)	(42-68)م	30 ثانية
	الاستطالة (extension))	72م	45 ثانية
دورة واحده	التمديد النهائي (final extension)	72م	7دقيقة
دورة واحده	خفض درجة الحرارة	4م	

حضر هلام الاكاروز باذابة 2غرام من الاكاروز (promega)في 100 مل من دارئ ال – Tris Borate – EDTA(TBE). بتركيز 1 X على صفيحة التسخين HOT PLATE وفي اثناء ذلك حضر قالب صب الهلام وثبت مشط تكوين الحفر (Comb) على بعد 1 سم من احدى حافتي القالب ثم صب الهلام داخل القالب الموضوع في وضع افقي تماما وترك يتصلب مدة 30 دقيقة (، Sambrook and Rusell,2001)ووضعت العينات في الحفر ثم وضعت في جهاز الترحيل الكهربائي وبدات عملية الترحيل لمدة ساعه وبفولتية مقدارها 100 فولت

قرئت النتيجة باستخدام جهاز انبعاث الاشعه فوق البنفسجية (UV transiluminator) للتقصي عن وجود قطعه المورث التي تشفر لل(VP4) والتي يبلغ طولها (876) وتصويرها (الجبوري،حوراء 2013).

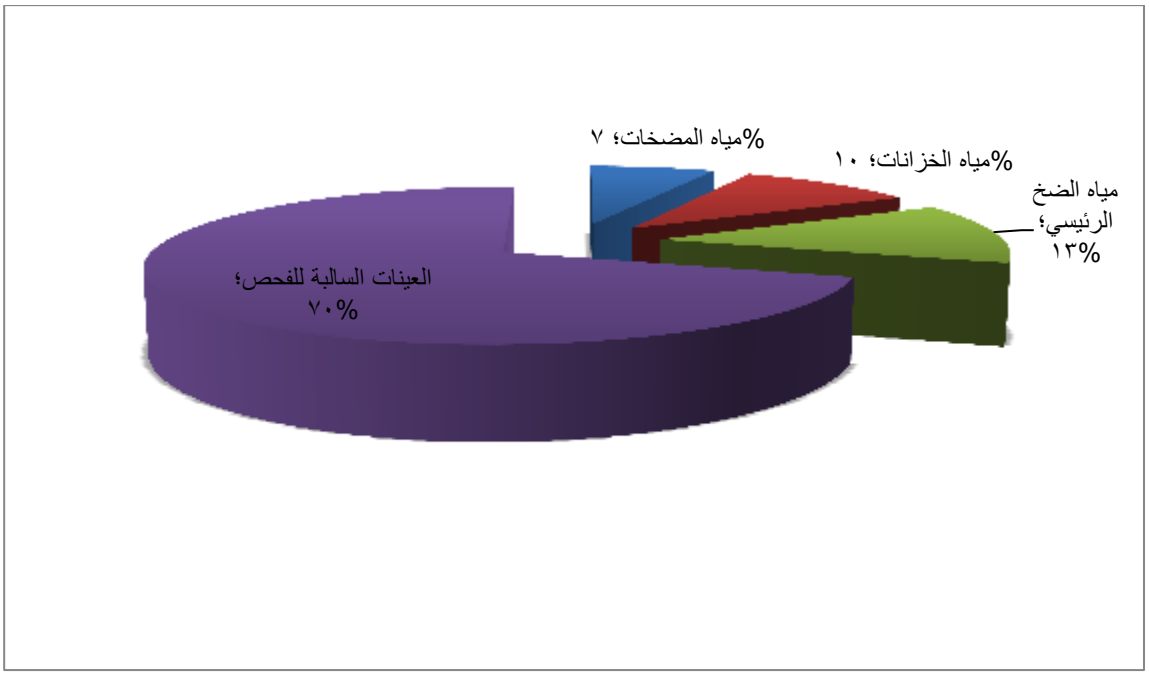
النتائج :

تم فحص عينات الماء من مناطق مختلفة من محافظة بابل حيث جمعت 55 عينة من الريف و45 عينه من المدينة وكانت كالاتي :35 عينة ماء مضخات تم العثور على RNA الفيروسي في 7 منها (3 من الريف و 4 من المدينة) اي بنسبة 20% ،و35 عينة من المياه الراكدة 10 عينات كانت موجبة للفحص (6 ريف و4 مدينة) اي بنسبة 28 % اما مياه الضخ الرئيسي فكان عددها 30 عينة كانت 13 عينة موجبة للفحص (10 من الريف و 3 من المدينة) اي 43% ،حيث كانت النتائج موزعة كالاتي :

جدول (3) توزيع العينات الموجبة في الريف والمدينة .

المصدر	الموقع	المجموع N= 35	الموجبة للفحص N= 35	السالبة للفحص N=65
ماء المضخات	الريف	4	7	28
	المدينة	3		
ماء راكد(خزانات)	الريف	11	15	20
	المدينة	4		
ماء ضخ رئيسي	الريف	10	13	17
	المدينة	3		

شكل (1)النتيجة الموجبة للترحيل الكهربائي لفيروس الروتا .



شكل 2 يوضح نسب العينات الموجبة لفحص فيروس الروتا

المناقشة :

يعد الاسهال من المشاكل الصحية الكبيرة التي تصيب الاطفال بعمر اقل من (5)سنوات ،يسبب مايقارب (1.8)مليون حالة وفاة سنويا ، وهناك العديد من المسببات المرضية المختلفة المسببة للاسهال المائي الحاد ،وتعد الفيروسات هي المسؤولة عن اكثر من نصف الحالات (Alian and Denis,2007; Boschi – pinto *et al.*, 2002)،يشكل فيروس الروتا نسبة اكثر من 50 % من حالات الخمج الفيروسية ويصيب كلا من البشر والحيوانات المحلية ، وان المجموعة (A)من فيروس الروتا هي المسؤولة عن اكثر من 90% من حالات التهاب المعدة والامعاء في البشر ،ويتسبب فيروس الروتا بوفاة اكثر من 527000 طفل سنويا في **الدول النامية** (wang *et al.,2010: WHO , 2011*).

وجدت الوحدات الفيروسية في عدد كبير من عينات الماء ،حيث كانت اغلب العينات الموجبة للفحص هي من المناطق الريفية والمدنية كانت من مناطق متقاربة من بعضها دلالة على ان الفيروس منتشر في المناطق القريبة من بعضها ،ان المسبب المرضي يستطيع الدخول في عينات ماء الشرب بكل سهوله من مصادر مختلفة اهمها تلوث تلك العينات من أحد الملوثات الطبيعية او الصناعية الحاوية على براز المصابين بالاسهال ذي المسبب الفيروسي ،اضافة الى هجرة الفيروس بطبقة التربة السطحية او تحت التربة تؤدي الى تلوث مياه الضخ الرئيسي ومن ثم تلوث مياه الخزانات ومنظومات التصفية تتابعيا وعلى الترتيب(Godfrey and smith ,2005) كما شوهد ايضا تزايد في اعداد العينات الموجبة في المناطق الريفية وذلك يعزى الى توحد مصد الماء وكذلك قلة الوعي الصحي وسهولة تلوث مصادر المياه بالفيروس من الاشخاص المصابين او من التربة نفسها (Rohayem,) *et al.*,2002 .

المصادر

الجبوري، حوراء جواد 2013 ، تحديد الانواع الوراثية لفيروس روتا الانسان في اطفال محافظة بابل باستعمال الطرق الجزيئية.جامعة بابل .كلية العلوم للبنات

Alain, S.and Dennis ,F. 2007 .Epidemiology of infectious acute diarrhea in France and Europe .Arch. Pediatr .,14(3):132-144.

Balk, D., T. Pullum, A. Storeygard, F. Greenwell, and M. Neuman. 2005. Spatial analysis of childhood mortality in West Africa. Popul. Space Place 10(33):175-216.

Boschi , pinto ,C ; Velebit ,L. and Shibuya, K. 2002 .Estimating child mortality due to diarrhea in developing counties: A metaanalysis review .Bull .World Health .Organ .,51;505 – 516 .

Godfrey, S., F. Timo, and M. Smith. 2005. Relationship between rainfall and microbiological contamination of shallow groundwater in northern Mozambique. Water SA 31:609-614.

Shulman L, Nakagomi T, Nakagomi O. Identification of feline and canine-like rotaviruses isolated from humans by restriction fragment length polymorphism assay. J Clin Microbiol. 1993;31:1783–1787.

Wang .F.T. ;Mast ,T.C.; Glass,R.J.; Loughlin ,J.and Seeger, J.D.(2010).Effectiveness of the pentavalent Rotavirus vaccine in preventing gastroenteritis in the United States, Pediat.,125(2) 208 -213.

WHO , (World Health Organization) (2011).Estimated Rotavirus deaths for children under 5 years of age: 2004,527 000. Immunization surveillance, Assessmentand Monitoring ,World Health Organization ,Geneva Switzerland.

Payment, P., A. Berte, and C. Fleury. 1997. Sources of variation in isolation rate of *Giardia lamblia* cysts and their homogeneous distribution in river water entering a water treatment plant. Can. J. Microbiol. 43**:**687-689.

Rohayem, J., R. Dumke, K. Jaeger, U. Schroter-Bobsin, M. Mogel, A. Kruse, E. Jacobs, and A. Rethwilm. 2006. Assessing the risk of transmission of viral diseases in flooded areas: viral load of the River Elbe in Dresden during the flood of August 2002. Intervirology 49**:**370-376.

Sambrook,.J. and Ruseell,D.W.(2001),Molecular cloning :A Laboratory manual 3th ed .Cold spring Harbor Laboratory press ,Cold spring Harbor ,NY,USA.

Vonsover A, Shif I, Silberstein I, Rudich . H, Aboudy Y, Mendelson E,