وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

التحري الجزيئي ومدى انتشار طفيلي *Giardia lamblia* في مدينة بعقوبة

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة
علم الحيوان / علم الطفيليات

من قبل

انتصار مهدي حمد الحسيني
(بكالوريوس علوم حياة ، ديالى ، 2003)

بإشراف

الأستاذ المساعد
الدكتورة نغم ياسين كاظم البياتي
كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة ديالى

الأستاذ المساعد
الدكتور هادي رحمن رشيد الطائي
كلية العلوم / جامعة ديالى

ذو القعدة 1433هـ **أيلول 2012 م**

الإهداء

إلى

النبي الأمي الذي أنار للبشرية طريق العلم

محمد (ﷺ)

تراب وطني الجريح والى كل من روى هذا التراب بدمه الطاهر الشريف شهداء العراق

إلى

من علمني النجاح والصبر ... إلى من ساعدني في مواجهة الصعاب ... أبي

إلى

الروح الخالدة في ذكرياتي والى مَن تحت قدميها الجنان ... أمي

وإلى

من كان بحراً من العطاء وسنداً لغاياتي ... أخي

إلى

من حملن اعز وأغلى الأسماء إلى قلبي ... أخواتي

إلى

من تتسابق الكلمات لتخرج معبرة عن مكنون ذاتها ,والى من ساندني لأصل إلى ما أنا فيه أستاذي الدكتور عباس عبود فرحان

إلى

كل من علمني كلمة وحرفاً ... أساتذتي الأفاضل .

انتصار

إقرار المشرفين وترشيح لجنة الدراسات العليا

نشهد بأن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ **(التحري الجزيئي ومدى انتشار طفيلي *Giardia lamblia* في مدينة بعقوبة)** التي قدمتها طالبة الماجستير (انتصار مهدي حمد) جرى تحت إشرافنا في كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان .

التوقيع
المشرف : أ.م. د. نغم ياسين البياتي
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة ديالى
التاريخ : / / 2012 م

التوقيع
المشرف :أ.م. د.هادي رحمن رشيد الطائي
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
كلية العلوم / جامعة ديالى
التاريخ : / / 2012م

((توصية رئيس قسم علوم الحياة))

بناء على التوصيات المتوافرة أرشح هذه الرسالة للمناقشة :

التوقيع

أ.م.د. نجم عبد الله جمعة الزبيدي
رئيس قسم علوم الحياة
التاريخ : / / 2012 م

إقرار لجنة المناقشة

نشهد أننا أعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ **(التحري الجزيئي ومدى انتشار طفيلي *Giardia lamblia* في مدينة بعقوبة)** وقد ناقشنا الطالبة **(انتصار مهدي حمد)** في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد بانها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان بتقدير (**امتياز**) .

عضو اللجنة

التوقيع
الاسم : م**.د. أسراء قاسم العبيدي**
التاريخ : 31 / 10 / 2012

عضو اللجنة

التوقيع
الاسم : **أ.م.د. محمد فرج المرجاني**
التاريخ : 31 / 10 / 2012

رئيس اللجنة

التوقيع
الاسم : **أ.د عباس عبود فرحان**
التاريخ : 31 / 10 / 2012

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع
الاسم : **أ.م.د. نغم ياسين البياتي**
التاريخ : 31 / 10 / 2012

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع
الاسم : **أ.م.د.هادي رحمن رشيد الطائي**
التاريخ : 31 / 10 / 2012

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة
أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع
الاسم **: أ.د عباس عبود فرحان**
التاريخ : 31 / 10 / 2012

الشكر والعِرفان

الحمد لله رب العالمين حمداً يليق بجلاله وقدرته بجميع المحامد على جميع النعم والصلاة والسلام على رسول الله أشرف خلقه وسيد المرسلين وحامل لواء المجد الصادق الأمين محمد (صلى الله عليه واله وسلم).

أما بعد ... فلا يسعني وانا اختم جهدي المتواضع إلا أن أقول انه لمن دواعي سروري أن تحظى الرسالة بكرم من أستاذي الفاضلين الدكتورة نغم ياسين البياتي من خلال اقتراحها موضوع البحث و الدكتور هادي رحمن رشيد الطائي من خلال الإشراف عليها بروحهما السمحة وعلميتهما الرصينة التي بدت واضحة من توجيهاتهما القيمة وملاحظاتهما التي كانت سندا وطمأنينة لي في تذليل الصعوبات . اسأل الله تعالى أن يمد في عمرهما صحة وأمانا وإيمانا وان يجازيهما خيرا في الدنيا والآخرة .

كما يلزمني الوفاء التوجه بالشكر إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة متمثلة بالدكتور عباس عبود فرحان ، والدكتور نجم عبد الله جمعة رئيس قسم علوم الحياة وجميع الأساتذة الأفاضل على ما زرعوه فيّ طوال سنوات الدراسة الأولية من جهود طيبة أتت ثمارها في كل حين .

ومن العرفان بالفضل أن أقدم خالص شكري وعظيم امتناني بشكل خاص للدكتور كريم سعدون لما أبداه من مساعدة جزاه الله خير الجزاء وأتوجه بالشكر للدكتور محمد خليفة والدكتور محمد عبد الدايم و الأستاذ عصام حامد في كلية العلوم والدكتور مصطفى في كلية الطب البيطري لما أبدوه من مساعدة داعية الله عز وجل أن يمدهم بالصحة والعافية واستمرار العطاء العلمي .

وأتقدم بأسمى آيات الشكر والعرفان لكوادر مختبرات مستشفى بعقوبة العام, ومستشفى البتول, والمستشفى الاستشاري, والمراكز الصحية في حي المصطفى و كنعان لمساعدتهم في جمع العينات ومع فرط ما أحمل في قلبي من محبة وعرفان بالجميل أتقدم بشكري الجزيل إلى جميع كوادر كلية التربية للعلوم الصرفة لمواقفهم الطيبة ودعمهم المعنوي طيلة مدة الدراسة والى الدكتور جاسم محمد لمساعدته في الإحصاء والسيد نصير احمد والسيد باسم نجم الدين والسيد علي شاكر والسيد حيدر لما أبدوه من مساعدة.

وفي خاتمة المطاف اهدي ثمرة جهدي المتواضع للأعز في عيوني أسرتي الكريمة .. أبي .. أخي ... وأخواتي ... أكراما لجهودهم وتقديرا لفضلهم وإجلالا لقدرهم .

الباحثة

قائمة المختصرات العلمية

المختصرات	المصطلح باللغة الإنكليزية
AF	Anterior Flagella
BSA	Bovin Serum Albumin
bp	Base pair
C	Cytosine
CF	Caudal Flagella
CO_2	carbon dioxide
DNA	Deoxy ribonucleic acid
EDTA	Ethylen diamin tetra acetic acid
G	Guanine
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
Mg	Magnesium
Mn	Manganese
PLF	Posterolateral Flagella
RNA	Ribonucleic acid
T.B.S	Total bilirubin Serum
TBE-buffer	Tris hydrochloride Boric Ethylen diamin tetra acetic acid
U.V	Ultra violet ray
VF	Ventral Flagella
WHO	World Health Organization
WR	Working Reactivos

قائمة المصطلحات

المصطلح باللغة الانكليزية	المصطلح باللغة العربية
Abdominal bloating	انتفاخ البطن
Abdominal cramp	تشنجات بطنية
Acute	حاد
Albumin	الألبومين
Anorexia	فقدان شهية
Anterior flagella	سوط أمامي
Antigen	مستضد
Apoptosis	الموت المبرمج للخلايا
Assemblage or groups	نويعات أو مجموعات
Atrophy and Shortening Microvilli	ضمور وقصر الزغابات الدقيقة
Axostyle	قلم محوري
Bile salt	أملاح الصفراء
Binary Fission	الانشطار الثنائي
Blepharoblast or Kintosome	الأجسام الجفنية
Caudal flagella	سوط ذنبي
Chromium	الكروم
Chronic	مزمن
Chymotrypsin	كيموتربسين
Concave	مقعر
Consistency	القوام
Convex	محدب
Copper	النحاس
Crypt hypertrophy	تضخم خبايا الأمعاء
Dehydration	الجفاف
Delayed of growth and development	تأخر النمو والتطور
Dorsal surface	السطح الظهري
Endoplasmic reticulum	الشبكة الاندوبلازمية

Entrotoxin - like molecule	جزيئات شبيهة بالسم
Fibrills	الليفيات
Fluorecent in sites hybridization	التهجين المتألق في الزجاج
Golgi bodies	أجسام كولجي
Infiltrate of inflammatory cells	ارتشاح الخلايا الالتهابية
Intergenic distance	المسافة بين الجينات
Karyosome	جسم نووي
Kinetoplasts or Chromatoid body	جسم كروماتيدي أو مولد الحركة
Lamina propria	الصفيحة الوسطية
Lipid peroxidation	أكسدة الدهون
Lysosomes	أجسام حالة
Malabsorption	سوء الامتصاص
Malnutrition	سوء التغذية
Median bodies	أجسام وسطية
Metabolism	الفعاليات الايضية
Mitochondria	المايتوكوندريا
Morphology	الشكل الخارجي
Mucous	مخاطي
Nausea	غثيان
Normal Saline	المحلول الملحي الفسلجي
Odor	رائحة
Open reading frames	قالب قراءة
Parabasal bodies	أجسام جنب قاعدية
Recombination	اتحادات
Reservoir	مضيف خازن
Posterior flagella	سوط خلفي
Steatorrhea	إسهال شحمي
Sucking disc or Adhesive	أقراص ماصة
Thermocycler	المبلمر الحراري
T helper cells	الخلايا اللمفية التائية المساعدة

Toxicity	السمية
Trophozoite	الطور الخضري
Ventral flagella	سوط بطني
Ventral surface	سطح بطني
Villous blunting	تثلم الزغابات
Virulence	عوامل الضراوة
Vomiting	تقيؤ
Watery	مائي
Weight loss	فقدان الوزن
Well-formed	صلب قوي
Zoonoses	الأمراض المشتركة

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوانه	الصفحة
1-4	النسبة المئوية للإصابة بالطفيليات المعوية بين إفراد العينة المفحوصين .	46
2-4	أعداد المصابين والنسب المئوية للإصابة بأنواع مختلفة من الطفيليات لمعوية .	47
3-4	أعداد ونسب الإصابة بطفيلي الـ *Giardia* في الذكور والإناث المفحوصين .	47
4-4	علاقة الإصابة بطفيلي الـ *Giardia* بأعمار الأفراد المفحوصين .	48
5-4	علاقة الإصابة بطفيلي الـ *Giardia* بعدد أفراد الأسرة .	49
6-4	علاقة الإصابة بطفيلي الـ *Giardia* بمصدر مياه الشرب .	49
7-4	علاقة الإصابة بطفيلي الـ *Giardia* بمنطقة سكن الأفراد المفحوصين .	50
8-4	علاقة الإصابة بطفيلي الـ *Giardia* بالتحصيل الدراسي للأب .	50
9-4	علاقة الإصابة بطفيلي الـ *Giardia* بالتحصيل الدراسي للأم .	51
10-4	مقارنة الفحص المجهري بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR .	52
11-4	معدلات أعداد خلايا الدم الحمر وخلايا الدم البيض وقيمة Hb عند الأشخاص المصابين وغير المصابين .	55
12-4	معدلات قيم الاختبارات الكيموحيوية عند الأشخاص المصابين وغير المصابين .	56

قائمة الأشكال

رقم الشكل	عنوانه	الصفحة
1-2	شكل توضيحي للطور الخضري Trophozoite وطور الكيس Cyst لطفيلي *Giardia lamblia*	8
2-2	شكل توضيحي لدورة حياة طفيلي *Giardia lamblia*	10
1-4	تشخيص طفيلي *Giardia lamblia* بطريقة تقنية PCR	53

قائمة المحتويات

الفصل الأول / المقدمة		
1	Introduction المقدمة	.1
3	Aims of the study أهداف الدراسة	.2.1
الفصل الثاني / استعراض المراجع		
4	Literature review استعراض المراجع	.2
4	History نبذة تأريخية	.1.2
4	Taxonomy of Parasite تصنيف الطفيلي	.2.2
5	Morphology الوصف العام للطفيلي	.3.2
6	Trophozoite الطور الخضري	.1.3.2
6	Cyst طور الكيس	.2.3.2
8	Life Cycle دورة الحياة	.4.2
11	Pathogenesis الإمراضية	.5.2
12	Clinical Signs العلامات السريرية	.6.2
12	Immune response الاستجابة المناعية	.7.2
14	Virulence عوامل الضراوة	.8.2
15	Diagnosis التشخيص	.9.2
15	Direct Method الطريقة المباشرة	.1.9.2
16	Immunological methods الطرائق المناعية	.2.9.2
16	Identification by Cultures Media التشخيص بالطريقة الزرعية	.3.9.2
17	Molecular Method الطريقة الجزيئية	.4.9.2
18	Genetic Structur of *Giardia* التركيب الوراثي للجيارديا	.10.2
19	Assembleges of *Giardia* المجاميع الجينية للجيارديا	.1.10.2
20	تأثير الطفيلي في بعض المعايير الكيموحيوية Effect of Parasite on Some Biochemical Markers	.11.2

22	Epidemology الوبائية	.12.2
24	انتشار طفيلي الجياريديا	.1.12.2
24	انتشار الطفيلي في العالم	.1.1.12.2
26	انتشار الطفيلي في الوطن العربي	.2.1.12.2
28	انتشار الطفيلي في العراق	.3.1.12.2
الفصل الثالث / المواد وطرائق العمل		
31	Materials and Methods المواد وطرائق العمل	.3
31	Material and Apparatus المواد والأجهزة المستخدمة	.1.3
31	Apparatus الأجهزة	.1.1.3
32	Chemicals Materials المواد الكيمياوية	.2.1.3
33	Laboratory Diagnosic Kit عدة التشخيص المختبري	.3.1.3
33	Preparation of Solutions تحضير المحاليل	.2.3
33	NaOH محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 %)	.1.2.3
33	HCl محلول حامض الهيدروكلوريك	.2.2.3
34	TBE-buffer	.3.2.3
34	Bovin Serum Albumin (BSA) البومين المصل البقري	.4.2.3
34	Normal Saline Solution المحلول الملحي الفسلجي	.5.2.3
34	Ethidium Bromide Stain صبغة اثيديوم بروما يد	.6.2.3
34	Iodine Stain صبغة اليود	.7.2.3
35	Agarose Gel Preparation تحضر هلام الاكاروز	.3.3
35	Methods طرائق العمل	.4.3
35	Study groups مجموعات الدراسة	.1.4.3
35	Samples Collection جمع العينات	.2.4.3
35	Stool Samples Collection جمع عينات البراز	.1.2.4.3
36	Blood Sample Collection جمع عينات الدم	.2.2.4.3
36	Sepration of Serum فصل مصل الدم	.3.4.3
36	Blood Film فحص صورة الدم الكاملة	.5.3

.6.3	تشخيص الطفيلي Parasite Diagnosis	36
.1.6.3	الفحص العياني Macroscopic Examination	36
.2.6.3	الفحص المجهري Microscopic Examination	37
.1.2.6.3	الفحص المباشر للبراز Direct Stool Examination	37
.2.2.6.3	طريقة التركيز Concentration method	37
.3.6.3	الفحص الجزيئي Molecular Examination	38
.1.3.6.3	استخلاص الدنا DNA Extraction	38
.2.3.6.3	اختبار البلمرة PCR	39
.7.3	الاختبارات الكيموحياتية Biochemical tests	41
.1.7.3	قياس تركيز الكالسيوم Ca في مصل الدم	41
.2.7.3	قياس تركيز حامض اليوريك في مصل الدم	42
.3.7.3	قياس تركيز الألبومين Albumin في مصل الدم	43
.4.7.3	قياس تركيز الحديد Iron في مصل الدم	44
.5.7.3	قياس تركيز البليروبين في مصل الدم Total bilirubin (T.B.S)	45
8.3	التحليل الإحصائي Statistical analysis	45
	الفصل الرابع / النتائج	
.4	النتائج	46
1.4	الإصابات المشخصة في الدراسة الحالية	46
2.4	بعض الجوانب الوبائية المؤثرة في نسب الإصابة بالجيارديا	47
3.4	مقارنة الفحص المجهري بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	51
4.4	فحص الحساسية لطرائق الاختبار المتبعة	52
5-4	فحوصات الدم والفحوصات الكيموحيوية	54
1.4.4	فحوصات الدم	54
2.4.4	الفحوصات الكيموحيوية	55

الفصل الخامس / المناقشة		
.5	المناقشة	57
1.5	الإصابات المشخصة في الدراسة الحالية	57
2.5	بعض الجوانب الوبائية المؤثرة في نسب الإصابة بالجيارديا	59
3.5	مقارنة الفحص المجهري بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	62
4.5	فحوصات الدم والفحوصات الكيموحيوية	63
الفصل السادس / الاستنتاجات والتوصيات		
	الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations	65
	الاستنتاجات Conclusions	65
	التوصيات Recommendations	66
المصادر العربية و الأجنبية		
	المصادر العربية	67
	المصادر الأجنبية	70
	ملحق – 1	104
الخلاصة باللغة الانكليزية		
العنوان باللغة الانكليزية		

الخلاصة

تم خلال المدة مابين شهر آب 2011 ولغاية نهاية شهر نيسان 2012 أجراء دراسة للتحري عن أنواع وانتشار الإصابة بالطفيليات المعوية ونسبها بشكل عام وطفيلي *Giardia lamblia* بشكل خاص بين المرضى المراجعين للمستشفيات والمراكز الصحية في مدينة بعقوبة في محافظة ديالى. تضمنت هذه الدراسة جمع 657 عينة براز لأشخاص تراوحت أعمارهم مابين أقل من خمس سنوات إلى 18 سنة فأكثر. وتم استخدام المسحة المباشرة في الكشف عن الطفيليات, كشف الفحص عن وجود خمسة أنواع من الطفيليات المعوية, ثلاثة منها من الحيوانات الابتدائية واثنين منها من الديدان وكانت نسب الإصابة الإجمالية في عموم المواقع قيد الدراسة كالآتي: 26.9% لاميبا الزحار *Entamoeba histolytica*, 8.371% للسوطي *Giardia lamblia*, 1.978% لاميبا القولون *Entamoeba coli*, 1.522% لدودة الإسكارس *Ascaris lumbricoides*, % 5.022للدودة الدبوسية *Enterobius vermicularis*.

ركزت الدراسة الحالية على انتشار طفيلي الجيارديا اللامبلية إذ سجلت نسبة إصابة كلية بالجيارديا بلغت8.371%, وتوزعت نسب الإصابة بطفيلي الجيارديا عند الإناث 8.389% مقابل 8.356% عند الذكور مع عدم وجود فروقات معنوية , وقد سجلت الدراسة الحالية أعلى نسبة للإصابة عند الفئة العمرية **18 ≤ 5** ≥ والتي بلغت 22.857 % بينما كانت أدنى نسبة للإصابة عند الفئة العمرية **5** ≤ 6.288 %. أظهرت النتائج ارتفاع نسبة الإصابة بطفيلي الجيارديا بزيادة عدد أفراد الأسرة, إذ سجلت أعلى نسبة إصابة لدى العوائل التي وصل عدد أفرادها إلى 14 فرد فأكثر 12.435%, بينما سجلت أوطأ نسبة لدى العوائل التي تراوح عدد أفرادها بين 4 - 5 أفراد 1.923%. كما بينت النتائج أن أعلى نسبة للإصابة كان ضمن فئة الإفراد الذين يشربون ماء النهر 17.647% وأوطأ نسبة إصابة ضمن فئة الأفراد الذين يشربون ماء الإسالة 4.0 %, ولم تظهر فروقات معنوية في نسب الإصابة في الريف والمدينة (8.4% و8.280% على التوالي), وقد لوحظ عدم وجود فروقات معنوية في العلاقة بين نسبة الإصابة بطفيلي الجيارديا والتحصيل الدراسي للأب و للام إذ سجلت أعلى نسبة للإصابة لدى الأشخاص الذين آبائهم وأمهاتهم غير متعلمين (12.565% و11.764%على التوالي), وأوطأ نسبة للإصابة لدى الأشخاص الذين آبائهم وأمهاتهم حاصلين على الشهادة الجامعية (3.947% و6.043% على التوالي).

تم استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في تشخيص طفيلي الجيارديا في هذه الدراسة وقد تمت مقارنة نتائج هذه التقنية بالنتائج المتحصل عليها بطريقة الفحص المجهري وأظهرت المقارنة كفاءة التشخيص باستعمال تقنية PCR إذ سجل الفحص حساسية بلغت 94.736% مقارنة بالفحص المجهري الذي بلغت حساسيته 57.894% .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن قيم فحوصات الدم عند الأشخاص المفحوصين كانت كالآتي: خلايا الدم الحمر(Red Blood Cells (RBC 4.323 10^9 /mm^3 في الأشخاص المصابين و 4.740 10^9 /mm^3 في الأشخاص غير المصابين, وكان معدل خلايا الدم البيض(White Blood Cells (WBC في الأشخاص المصابين 7.698 10^3 /mm^3 مقارنة بالأشخاص غير المصابين 7.278 10^3 /mm^3 إذ لوحظ ارتفاع طفيف جداً عند الأشخاص المصابين مقارنة بالأشخاص غير المصابين, كما انخفضت قيمة هيموكلوبين الدم Hb عند الأشخاص المصابين 11.496 غم/ديسي لتر مقارنة بالأشخاص غير المصابين13.251غم/ديسي لتر. وسجل ارتفاع معنوي في قيمة خلايا الدم البيض اللمفاوية Lymphocytes عند الأشخاص المصابين مقارنة مع الأشخاص غير المصابين (47.876% و 32.868% على التوالي). كما لوحظ توافر ارتفاع معنوي في قيمة خلايا الدم البيض الحمضة Eosinophils عند الأشخاص المصابين مقارنة بالأشخاص غير المصابين (7.412% و3.230 % على التوالي) , أما بالنسبة إلى قيمة خلايا الدم البيض العدلة Neutrophils فقد لوحظ أن معدل عدد تلك الخلايا في الأشخاص المصابين كان أوطأ (وبصورة معنوية) منه عند الأشخاص غير المصابين (45.641% و56.451% على التوالي). ولم يلاحظ توافر اختلافات في قيم خلايا الدم البيض الوحيدة Monocytes و خلايا الدم البيض القعدة Basophils .

كما بينت الدراسة الحالية تأثير الإصابة في بعض المكونات الكيموحيوية إذ تم تسجيل قيم كل من البليروبين الكلي والكالسيوم وحامض اليوريك والألبومين والحديد لكل من الأشخاص المصابين وغير المصابين بطفيلي الجيارديا وتبين أن معدل البليروبين الكلي Total bilirubin كان أوطأ عند المصابين (0.7127 مول/لتر) مقارنة بغير المصابين (0.7600 مول/لتر). وفيما يخص معدل الكالسيوم Calcium فقد لوحظ توافر انخفاض عند الأشخاص المصابين بطفيلي الجيارديا (1.383 ملي مول/لتر) مقارنة بالأشخاص غير المصابين (2.357 ملي مول/لتر). ولوحظ ارتفاع قيمة حامض اليوريك Uric acid عند الأشخاص المصابين بطفيلي الجيارديا (268.07 مول/لتر) مقارنة بغير المصابين (253.2 مول/لتر) أما بالنسبة لقيمة الألبومين Albumin فقد انخفضت وبصورة معنوية عند الأشخاص المصابين (32.156 غرام/لتر) مقارنة بالأشخاص غير المصابين (40.971 غرام/لتر). فيما كانت قيمة الحديد Iron (11.678 مول/لتر) عند الأشخاص المصابين مقارنة بالأشخاص غير المصابين (14.908مول/لتر).

الفصل الأول

المقـدمــة

Introduction

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

الفصل الرابع

النتائـج

Results

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

المصادر

References

الملحق

1. المقدمة Introduction

الإسهال حالة مرضية غالباً ما يتعرض لها الإنسان في أوقات مختلفة من السنة نتيجة التعرض لمؤثرات باطنية غير صحية أو ربما التعرض لمخاطر أخرى تتعلق بطبيعة معيشة الفرد وتحدث بعض حالات الإسهال كاستجابة دفاعية من قبل الجسم, وبشكل ظاهرة فسلجية تستهدف تخليص الجسم من المواد السامة أو من بعض الإصابات بالمسببات المرضية كالفايروسات والبكتريا, والطفيليات, وذلك لغرض قذفها إلى خارج القناة الهضمية (الكلاك والنعيمي, 2007). و يعد طفيلي *Giardia lamblia* واحداً من المسببات المهمة للإسهال Diarrhea , كما ويعد الطفيلي مسبباً رئيسياً لحدوث الوفيات لملايين الأشخاص كل سنة (Verweij *et al*., 2004). وقد سجلت منظمة الصحة العالمية World Health Organization (WHO) 200 مليون إصابة بالطفيلي على مستوى العالم كما أكدت المنظمة أن هناك 500000 إصابة جديدة سنوياً بهذا الطفيلي .

يصيب الطفيلي الجزء العلوي من الأمعاء الدقيقة في الإنسان وبعض الحيوانات (Lalle, 2010 ; Cox, 1993), ويسبب ما يعرف بداء الجيارديات Giardiasis أوLambliasis وأحيانا يسمى بحمى القندسBeaver fever, لأنه ظهر بنسبة عالية في الأشخاص الذين يسكنون المخيمات والذين يشربون الماء الملوث الذي تسكنه القنادس (Roberts and Janovy, 2000). والمرض أكثر شيوعاً بين الأطفال مقارنة بالبالغين حيث يسبب العديد من المشاكل لديهم كسوء الامتصاص Malabsorption, فقدان الوزن Weight loss وتأخر النمو والتطورDelayed of growth and development (David *et al*., 2011). كما ويرتبط المرض بسوء التغذية وحدوث نقص في بعض العناصر والفيتامينات المهمة للإنسان (El-Sayad *et al*., 2011).

تنتشر الإصابة بهذا الطفيلي في أنحاء العالم جميعها وبخاصة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية حيث تصل نسبة انتشارها إلى 30 % في تلك المناطق (الزرفي, 2005), ترتفع نسبة وجوده في البلدان النامية والمجتمعات المزدحمة التي تفتقر إلى الشروط الصحية (WHO, 1987). فضلاً عن انتشاره في البلدان المتطورة فالمرض يصيب تقريباً 2 % من البالغين و6 – 8% من الأطفال. وقد عدّ الطفيلي المسبب لحدوث 68% من حالات الإسهال المنقولة بالماء في الولايات المتحدة الأمريكية والمملكة المتحدة (Haque, 2007 ; WHO, 1987

; Mohamadnezhad *et al.*, 2008). تختلف نسبة الإصابة بهذا الطفيلي باختلاف البلد وباختلاف المنطقة الجغرافية في البلد نفسه , وتتأثر نسبة الإصابة بداء الـ Giardiasis بعدة عوامل منها العمر, المنطقة الجغرافية , الظروف الاجتماعية والاقتصادية, العادات الصحية, الحالة الغذائية وحالة المضيف المناعية (Ayalew, 2006 ؛ غندور وجماعته , 2008) .

هناك عدة طرائق لتشخيص الطفيلي منها الطرائق المجهرية والمناعية والجزيئية , تعتمد الطريقة المجهرية على إيجاد طوري الطفيلي الخضري و المتكيس في براز الشخص المفحوص (Younas *et al.*, 2008). إما الطريقة المناعية فتعتمد على التفاعل بين الأضداد و مستضدات الطفيلي (Behr *et al.*, 1996). إما الطريقة الجزيئية فتعتمد على إكثار نسخ الحامض النووي DNA حيث يتم فيها استنسال قطعة محددة من الحامض النووي ومضاعفة إنتاجها (Marquardt *et al.*, 2000).

لقد صنفت الجيارديا على أساس الشكل الخارجي لها Morphology والتراكيب الداخلية وعلى أساس المضيف الذي تتطفل عليه (Hill, 2001). وبتقدم التقنيات الحديثة وظهور عصر الجينوم والوراثة الجزيئية توجهت الدراسات للبحث عن التغايرات الوراثية بين الأنواع العائدة لجنس الجيارديا بل امتدت هذه الدراسات لتشمل البحث عن التغايرات الوراثية في النوع الواحد وبيان فيما لو كان هناك مجاميع ثانوية أو نويعات أو سلالات ضمن النوع الواحد (Lebbad *et al.*, 2008) ومن هنا أشارت الدراسات اللاحقة إلى أن الأنواع العائدة للجنس *Giardia* تتضمن نويعات وضعت تحت مصطلح Assemblage أو Groups اعتماداً على التركيب الجيني لها, فقد وجد أن هناك 8 أنواع رئيسة من الجيارديا تبعاً للتحليلات الجزيئية, وضعت بمجاميع D , C, B, A E , F , G وH . يصيب النوعين B وA الإنسان والعديد من اللبائن فيما يصيب النوعين D وC الكلاب ويصيب النوع E الجمال, والأغنام, والماعز والخنازير أما النوع F فيصيب القطط وعزل النوع G من الجرذان وH يصيب حيوانات الماشية ومع ذلك فان هناك اتفاقاً على أن هذه البحوث ما زالت بحاجة إلى دراسات عميقة لإثباتها بصورة قاطعة (Monis *et al.*, 1999 ; Lebbad *et al.*, 2008) .

2.1.أهداف الدراسة Aims of the study

نظراً لانتشار الإصابة بطفيلي الـ *Giardia* ولقلة المعلومات المتوافرة عن وبائية هذا الطفيلي في محافظة ديالى, ولقلة الدراسات عن الجانب الجزيئي لإغراض تشخيص الطفيلي في العراق عموماً وفي ديالى على وجه الخصوص لذا صممت هذه الدراسة بهدف :

1. إجراء دراسة عن بعض الجوانب الوبائية لبيان مدى انتشار الطفيلي في مدينة بعقوبة والعوامل المؤثرة في انتشار هذا الطفيلي .
2. استخدام تقنية الـ PCR الحديثة ومقارنتها بالطرائق الاعتيادية في تشخيص الطفيلي .
3. إجراء بعض الاختبارات الكيموحياتية على مصل الأشخاص المفحوصين وبيان مدى تأثير الإصابة بالطفيلي في هذه المؤشرات عند الأشخاص المصابين مقارنة بالأشخاص غير المصابين .

2.استعراض المراجع Literature review

1.2 : نبذة تأريخية Historical background

يعد طفيلي *Giardia lamblia* كائن حي مجهري , سوطي, وحيد الخلية, حقيقي النواة . يسبب مرض الإسهال في أنحاء العالم كافة. يمر بطورين, الطور المتكيس (Cyst) والطورالخضري (Trophozoite) في دورة حياته (Minvielle *et al*., 2008). اكتشف من قبل العالم فان ليفنهوك قبل 331 سنة تقريباً عند فحصه لبرازه تحت المجهر ذي العدسة الواحدة وبعد حوالي 200 سنة تم أعطاء اسم للكائن الحي (Ford, 2005). ويعد الباحث Lamble أول من عزل الـ *Giardia* من براز الأطفال الذين يعانون من الإسهال عام 1859 ووضعه تحت اسم *Cercomonas intestinalis* , فيما تمكن Kanstler عام 1882 من عزل طفيلي *Giardia* من صغار الضفادع Tad poles ووضعه تحت اسم *Giardia agilis* اعتزازاً وتقديراً لأستاذه البروفيسور Alfard Giard (Lebbad, 2010). وفي عام 1888 أطلق الباحث Raphael Antatole Emile Blanchard تسمية *Lamblia intestinalis* على الطفيلي, أما التسمية الثنائية *Giardia lamblia* فقد وضعت من قبل Stiles عام 1915 تخليداً للعالمين الفرنسي Giard والعالم Lambl من الباراغواي (Ankarklev, 2012) .

بقيت تسمية الطفيلي ولفترة طويلة موضع جدال بين الباحثين , فتسمية *Giardia lamblia* تستعمل بشكل عام في أمريكا الشمالية , وتسمية *Giardia intestinalis* تستعمل بشكل رئيس في أوربا, أما التسمية *Giardia duodenalis* فيفضل استعمالها بشكل واسع في استراليا Espelage (*et al*., 2010). استمرت بحوث العلماء حول الجيارديا لفترة طويلة ليدركوا بأنه السبب في بعض حالات انتشار الإسهال, وذلك في سبعينيات القرن الماضي , فقد كان الاعتقاد السائد حتى ذلك الوقت أن طفيلي الجيارديا كائن غير مؤذٍ وغير ممرض في الأمعاء, وقد أوضحت تلك البحوث انه يسبب الإسهال في العديد من الحالات (Monis *et al*., 2009). لذا فقد أضافت منظمة الصحة العالمية جنس الجيارديا إلى الطفيليات الممرضة (WHO, 1981).

2.2 : تصنيف الطفيلي Taxonomy of Parasite

صنف الطفيلي *Giardia lamblia* وفقاً لما جاء في (Thompson *et al*., 2000 ; Chernin, 2000 ; Hill , 2001) :

Phylum :- Protozoa
Sub phylum :- Sarcomastigophora
Super class :- Mastigophora
Class :- Zoomastigophora
Order :- Diplomonadida
Family :- Hexamitidae
Genus :- *Giardia*
Species :- *Giardia lamblia*

يصيب جنس *Giardia* أنواعاً عديدة من الحيوانات بضمنها اللبائن, الزواحف, الطيور, الحيوانات الداجنة والبرية والإنسان (Marangi *et al*., ; Van der Giessen *et al*., 2006 ; Alam *et al*., 2011 ; 2010). وقد صنف ما يقارب الأربعين نوعاً من جنس الجيارديا اعتماداً على نوع المضيف الذي عزل الطفيلي منه مثل *G. bovis* المعزول من الأبقار و *G. caprae* المعزول من الأغنام والماعز و *G. canis* المعزول من الكلاب و *G. cati* المعزول من القطط و *G. cavia* المعزول من الخنازير (Levine, 1985). فيما نجد أن العالم Filice قد صنف الأنواع التابعة لجنس الجيارديا عام 1952 اعتماداً على شكل الطور الخضري , والجسم الوسطي Median body والمضيف المعزول منه الطفيلي إلى الأنواع *G. lamblia* والذي يصيب اللبائن, الإنسان, القوارض, الزواحف ومن المحتمل الطيور, ويكون الطور الخضري كمثري الشكل والجسم الوسطي يكون بشكل مخلب مستعرض (Adam, 2001), و *G. agilis* يصيب البرمائيات, ويكون الطور الخضري طويل ورفيع والجسم الوسطي يشبه الدمعة, و *G. muris* يصيب القوارض ويكون الطور الخضري قصير ومستدير والجسم الوسطي صغير ودائري (Adam, 2001), و *G. ardae* يصيب طائر مالك الحزين ويكون شكل الجسم الوسطي مشابه للنوعين *G. muris* و *G. lamblia*, أما النوع *G. psittaci* فيصيب طيرالببغاء الاسترالي ويكون شكل الجسم الوسطي مشابهاً للنوع *G. lamblia* (Caccio *et al*., 2009), فيما يصيب *G. microti* القوارض ويكون شكل الجسم الوسطي مشابهاً للنوع *G. muris* (Shalaby *et al*., ; Lebbad, 2010 ; Ayalew, 2006 ; 2011).

3.2 : الوصف العام للطفيلي General Morphological description

يكون طفيلي *Giardia lamblia* بشكلين أو طورين هما الطور الخضري Trophozoite وطور الكيس Cyst (Espelaqe *et al*., 2010) ويتوافر هذان الطوران في الأمعاء الدقيقة للمضيف المصاب (Wang *et al*., 2007) .

1.3.2 : الطور الخضري Trophozoite

يكون الطور الخضري كمثري الشكل يتراوح طوله بين9-20 مايكرومتر وعرضه بين7-15 مايكرومتر وسمكه بين 2-4 مايكرومتر (بيك وديفز, 1985 ; Espelage *et al.*, 2010), جانبي التناظر, وشكله يشبه مضرب التنس الخالي من المقبض (شكل2−1), ويتميز الطور الخضري Trophozoite بان نهايته الأمامية مستديرة , بينما تكون نهايته الخلفية مستدقة ويكون سطحه الظهري Dorsal surface محدباً Convex والبطني Ventral surface مقعراً Concave, كما يحتوي في جزئه الأمامي على نواتين كبيرتين نسبيا, وتحتوي النواة على جسم نووي Karyosome كبير ومركزي الموقع (الحديثي وعواد, 2000). يمتد قلمان محوريان Axostyles على طول جسم الطفيلي (يعطيان صلابة له). يوجد في الجهة البطنية للطفيلي أقراص ماصة Sucking disc or Adhesive بيضوية الشكل ومقعرة تشغل حوالي ثلاثة أرباع جسم الطفيلي, وتستعمل للالتصاق بالغشاء المخاطي للأمعاء ولمقاومة حركة الأمعاء التموجية (Newman and Nisengard, 1988 ؛ مولان وميرو, 1990). كما ويوجد خلف الأقراص الماصة جسمان وسطيان Median bodies شكل (2-1) وهي صفة مميزة لجنس الجيارديا (Olsen, 1974), وقد عدها العديد من الباحثين أجساما جنب قاعدية Parabasal bodies والقسم الآخر عدها Kinetoplasts أو جسم كروماتيدي Chromatoid body ولكن التركيب الدقيق للأجسام الوسطية اظهر أنها ليست شبيهة بأي من هذه التراكيب (Roberts and Janovy, 2000).

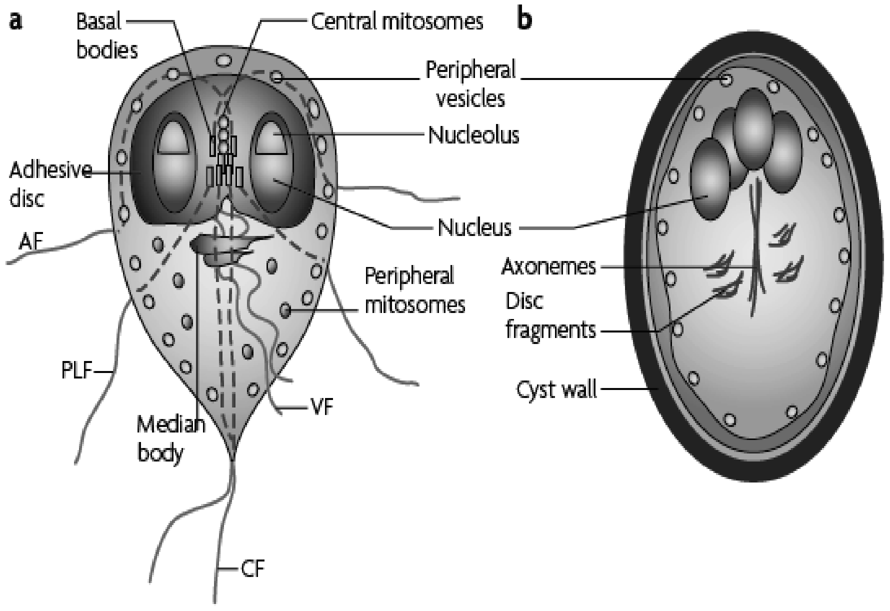
تمتلك الجيارديا أربعة أزواج من الاسواط زوجاً أمامياً Anterior flagella وزوجاً بطنياً Ventral flagella وزوجاً خلفياً Posterior flagella, وزوجاً ذنبياً Caudal flagella وتنشأ هذه الأزواج الأربعة من الأجسام الجفنية Blepharoblast أو Kintosome الواقعة بين الجزء الأمامي للنواتين وبهذا فان جميع الاسواط تمر من خلال السايتوبلازم لمسافة معينة قبل انطلاقها بصورة حرة خارج الجسم (Roberts and Janovy, 2000 ; Olsen, 1974) .

2.3.2 : طور الكيس Cyst

يكون الكيس دائري أو اهليلجي الشكل, يتراوح طوله بين 12-15 مايكرومتر وعرضه بين 6-8 مايكرومتر ويحتوي عادة على أربعة انويه فضلاً عن وجود بقايا الأقلام المحورية والجسم الوسطي (Tashima *et al.*, 2009), وقد يحتوي على بقايا بعض الأعضاء الخلوية الأخرى وبشكل رئيس الاسواط والأجسام الجفنية Blepharoblasts وكما موضح في شكل (2-1). يحاط الكيس

بجدار خارجي سميك يحميه من التغيرات البيئية (Chernin, 2000) ويظهر جدار الكيس تحت المجهر الالكتروني مكوناً من طبقة من الليفيات Fibrills سمكها (0.3) مايكرومتر وكذلك يحتوي على مواد شبيهة باللكتين وهذه المواد تساعد الكيس على مقاومة الظروف البيئية غير الملائمة وقد يحتوي جدار الكيس على مادة كالكتوزامين Galactosamine (العنبكي, 2002 Payne and Artzer, 2009 ;).

الكيس هو الطور المعدي ويمكنه البقاء نشطاً في البيئة حيث يقاوم درجات الحرارة , الجفاف وبعض المطهرات (Akay *et al.*, 2009 ; Roberts and Janovy, 2000). كذلك يقاوم عمليات الكلورة التقليدية المستخدمة في تنقية المياه وهذا يمكنه من الاستمرار والبقاء معدياً لفترات طويلة في الماء تصل إلى أشهر عدة. تطرح الاكياس بأعداد كبيرة في البراز(Nikaeen *et al.*, 2003 Julio *et al.*, 2012 ;). ومن الممكن أن يعيش الكيس مدة طويلة تحت الأظافر (سعيد وحميد, 2010). يقتل الطفيلي إذا ما أضيفت كمية أكثر من الاعتيادية من الكلور أو اليود (Meyer and Jarroll, 1980), كما أن عمليات الغلي والتجميد والتذويب تمنع 99 % من الأكياس من التحول إلى الطور الخضري (Markell *et al.*, 1986), وقد وجد أن أكياس طفيلي الجيارديا غير قادرة على البقاء حية بعد التجميد (de Lalla *et al.*, 1992) .



(أ) **Trophozoite** (ب) **Cyst**

شكل(2-1): شكل توضيحي (أ) الطور الخضري Trophozoite و(**ب**) طور الكيس Cyst لطفيلي *Giardia lamblia* (Ankarklev *et al*., 2010)

Posterolateral Flagella: PLF , Caudal Flagella : CF, Anterior Flagella :AF .Ventral Flagella :VF

4.2 : دورة الحياة Life Cycle

يستقر طفيلي الجيارديا في الجزء العلوي من القناة الهضمية ويمتلك دورة حياة مباشرة (Tasic *et al*., 2008 ; Adam, 1991). وتشتمل دورة حياته البسيطة على شكلين أو طورين كما ذكر سابقاً هما طور الكيس والطور الخضري, إذ تبدأ دورة الحياة بابتلاع الأكياس مع الماء والغذاء الملوثين بها أو عن طريق الانتقال المباشر من شخص لآخر أو عن طريق الأظافر الملوثة (Eckmann, 2003 ; سعيد وحميد, 2010). بعد ابتلاع الكيس من قبل المضيف الفقري يتعرض إلى الحامض المعدي في إثناء مروره خلال معدة المضيف ومنها إلى تجويف الأمعاء إذ تحدث عملية التحرر من الكيس Excystation فتتحرر بذلك الأطوار الخضرية, إذ يعطي الكيس الواحد اثنين من الأطوار الخضرية (Manning *et al*., 2011; Adam, 2001). وتتكاثر الأطوار الخضرية بوساطة الانشطار الثنائي Binary Fission وتلتصق هذه الأطوار بالطبقة الطلائية

المعوية بوساطة قرص الالتصاق (Adam *et al*., 2010 ; Ballweber, 2001; Marquardt *et al*., 2000). تمثل عملية تماس جسم الطور الخضري مع المستقبلات الخاصة على الطبقة الطلائية للأمعاء المرحلة الأولى لعملية الالتصاق, أما مرحلة التصاق القرص فتعد المرحلة اللاحقة والأساس لهذه العملية (Farthing *et al*., 1986) .

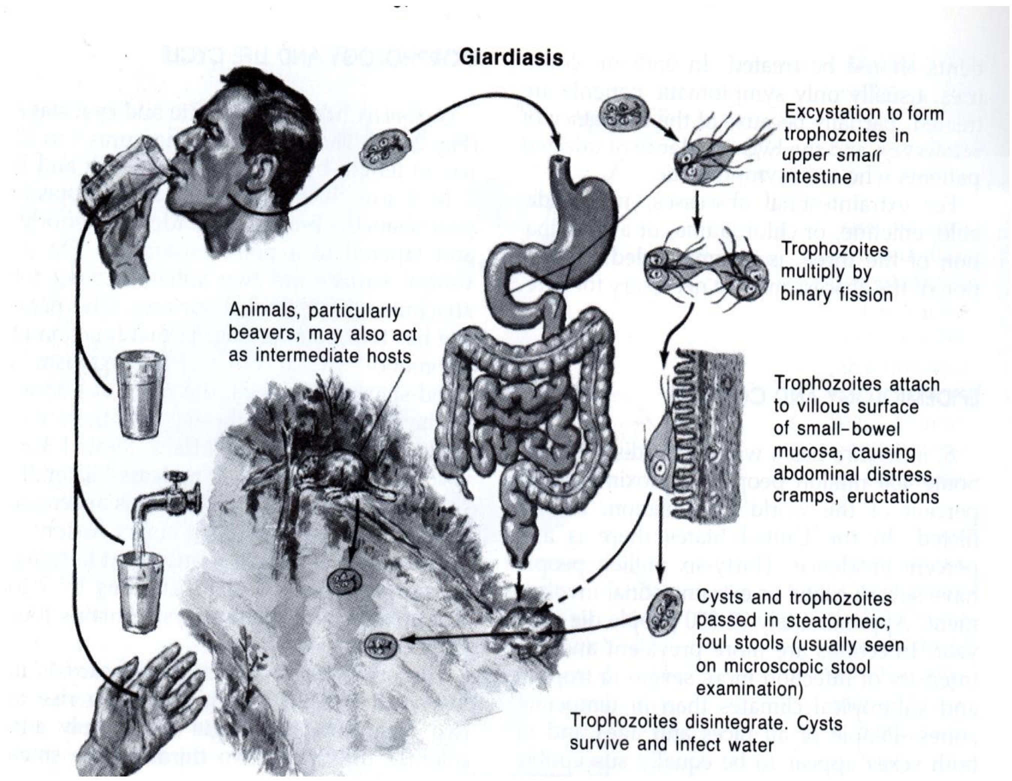
تحدث عملية تحرر الأطوار الخضرية من الكيس نتيجة أشارات متوافرة في تجويف المعدة والاثني عشري للمضيف كانخفاض أو ارتفاع درجة الحموضة pH والصفراء (Reiner *et al*., 2003 ; Eckmann, 2003). إذ تتعرض الأكياس المبتلعة للحامض المعدي خلال عبورها معدة المضيف, وبعد الدخول إلى الأمعاء الدقيقة وبتحفيز من قبل pH الأمعاء القاعدي وغاز CO_2 ووجود بعض الإنزيمات كالتربسين Trypsin و كيموتربسين Chemotrypsin (Hetsko *et al*., 1998 ; Eckmann and Gillin, 2001) يتحرر الطفيلي وينقسم بسرعة بعد خروجه من الكيس وتزداد إعداده لتلتصق بطلائية الأمعاء في الصائم و الاثني عشري (Satoskar *et al*., 2009). لقد وجد بأن لأملاح الصفراء Bile salts دوراً مهماً في نمو الأطوار الخضرية للطفيلي, إذ أنها تحتوي على دهون مفسفرة, وأن هذه الدهون لها دور في نمو وتكاثر الطور الخضري فضلاً عن ذلك فان الأمعاء توفر مواداً غذائية مثل الكاربوهيدرات الضرورية للنمو. وتفسر هذه الأسباب تفضيل الطفيلي لهذا الجزء من الأمعاء الدقيقة (Adam, 2001) .

إن عملية التحرر من الكيس هي سلسلة منسقة جداً من الأحداث الجزيئية والفسلجية والتركيبية تبدأ عندما يتعرض الكيس للمحفزات البيئية الملائمة فهي تتطلب مساهمة الخلايا الطلائية للأمعاء (Hill, 2001). وأشارت بعض الدراسات إلى توافر مستقبلات على سطح الخلايا الطلائية لمادة اللكتين Lectins المتوافرة على سطح الطفيلي وقد تكون هذه مادة مساهمة لالتصاق الطفيلي بالطلائية, كما أن الاسواط والقرص الماص للطفيلي يساهمان في عملية تثبيت الطفيلي على سطح الخلايا الطلائية للأمعاء عن طريق القوة الناتجة من الضغط المتولد عن التصاق القرص الماص بسطح الخلايا, وبذلك فان القوة الميكانيكية والهيدروديناميكية Hydrodynamic المتوالدة عن تقلص بروتينات القرص الماص تمثل القوة الأساسية في عملية الالتصاق (Hill, 2001). كما وجد أن هناك 190 جيناً للبروتينات السطحية في جينوم الطفيلي واحد فقط من هذه الجينات يعبر عنه في عملية الالتصاق وان هذا البروتين يتغير كل 6 - 13 جيل (Artezer , 2009).

تمر الأطوار الخضرية غير الملتصقة بطلائية الأمعاء إلى الجزء السفلي من الأمعاء (Gillespie and Pearson, 2001) إذ تحدث عملية التكيس Encystation, وتبدأ هذه العملية

بتحفيز من انخفاض في تركيز أملاح الصفراء وانخفاض تركيز الكوليسترول Cholesterol (Gardner and Hill, 2001) .

يمكن رؤية الأطوار الخضرية في سائل الاثني عشري والصائم وفي البراز في حالة الإسهال لكنها عموماً لا توجد في البراز الصلب وهي غير مقاومة للظروف البيئية الخارجية على العكس من الأكياس التي تكون أكثر مقاومة وقد تبقى في الماء لشهور عدة على الأقل, كما أنها الأساس لإصابات الإنسان حيث أن ابتلاع عشرة أكياس تؤدي إلى الإصابة بالطفيلي (Roberts and Janovy, 2000) .



Cysts ingested in contaminated, untreated Stream water; in inadequately treated tap Water; or via infected food handlers

شكل (2-2) : شكل توضيحي لدورة حياة طفيلي *Giardia lamblia* (Roberts and Janovy, 2000) .

5.2 : الامراضية Pathogenesis

يتسبب الطفيلي بحدوث الإسهال Diarrhea, الجفاف Dehydration, الغثيان Nausea التقيؤ Vomiting, سوء التغذية Malnutrition وسوء الامتصاص Malabsorption (Botero-Garcés *et al*., 2009), كما أن الإصابة بهذا المرض تكون في أغلب الأحيان مصحوبة بتغيرات وظيفية وتركيبية في الطبقة الطلائية المعوية (Eckmann, 2003), إذ تؤدي الإصابة إلى ضمور وقصر في الزغابات الدقيقة Atrophy and shortening microvilli (Buret, 2008). وقد أشارت عدد من الدراسات إلى أن حدوث الضمور وقصر الزغابات الدقيقة يؤدي إلى أحداث نقص في الأنزيمات المفرزة كاللاكتيز وضعف امتصاص المواد الغذائية المهضومة (Buret, 2008 ; Tigabu *et al*., 2010). فضلاً عن ذلك فإن طريقة التصاق الطور الخضري بجدار الأمعاء يسبب تهيجاً مع التهاب الغشاء المخاطي للأمعاء مصحوباً بأسهال متتابع حاد Acute أو مزمن Chronic (الكواز, 1992 ; Savona-Ventura, 2002), وهذا ما يؤدي إلى حدوث سوء امتصاص البروتينات, الكربوهيدرات, الدهون, الكالسيوم والفيتامينات (Muniz-Junueira *et al*., 2002) ولاسيما الفيتامينات الذائبة بالدهون مثل فيتامين(A, D, E, K) وفيتامين B12 الذائب في الماء وسكر اللاكتوز (De Morais *et al*., 1996 ; Shnawa, 1995). وتشير بعض الدراسات إلى أن الطفيلي يؤدي إلى زيادة في إفراز ايونات الكلور Chloride وقلة امتصاص الكلوكوز والصوديوم والماء, وهذا أيضاً قد يؤدي إلى حدوث الإسهال (Walls, 2010).

وتشير الدراسات الحديثة إلى أن إمراضية الجيارديا مازالت غير واضحة المعالم (Ankarklev *et al*., 2010). وهناك مجموعة من الفرضيات التي وضعت لتفسيرها منها : الضرر المباشر الذي يسببه الطفيلي للزغابات والخلايا الطلائية للأمعاء, تداخل الاستجابة المناعية وتسببها في زيادة إفراز السوائل الجسمية وإتلاف الأمعاء والنظرية الأخيرة هي تسبب الطفيلي في تغيير كمية الصفراء المفرزة أو تغييره للأنواع الحياتية الطبيعية Flora للأمعاء, وفضلاً عن وجود فرضية جديدة محورها تسبب الطفيلي في الموت المبرمج للخلايا Apoptosis في طلائية الأمعاء. وعلى الرغم من كل هذه الفرضيات تبقى ميكانيكية الطفيلي لأحداث المرض غير مفهومة فالطفيلي قادر على أحداث المرض دون الحاجة إلى اختراق طلائية الأمعاء (Walls, 2010). فضلاً عن تداخل عوامل أخرى مع حدوث وظهور الامراضية وتشمل عمر الشخص المصاب وعدد الأكياس المبتلعة (Walls, 2010).

6.2 : العلامات السريرية Clinical Signs

بينت الدراسات السريرية بان ابتلاع عشرة أكياس من الطفيلي يمكن أن تصيب البشر بالمرض وان ثلثي المصابين قد لاتظهر عليهم الأعراض, ويختلف داء الجيارديات من حيث الشدة والمدة حيث

تتراوح الإصابة من عدم توافر أعراض إلى أعراض حادة تتمثل بإسهال شحمي Steatorrhea شديد لايحتوي على دم أو خلايا قيحية (Wintrobe *et al.*, 1974) فضلاً عن غازات معوية شديدة, انتفاخ البطن Abdominal bloating, التشنجات البطنيه Abdominal cramp, فقدان الشهية Anorexia, الغثيان, والتقيؤ في بعض الأحيان (Wintrobe *et al.*, 1974 ; Al-Mekhlafi *et al.*, 2005) ونقص الوزن Weight loss ويستمر هذا لمدة أسبوع إلى أربعة أسابيع أو لأشهر عند الأطفال مما يؤدي إلى سوء الامتصاص والتغذية (Hanevik *et al.*, 2009). وقد تتحول هذه الأعراض الحادة إلى أعراض مزمنة لتشمل إسهالاً ذا رائحةٍ كريهةٍ مع زيادة في الخلايا الحمضة ونقص الوزن (Dos santos and Vituri, 1996).

7.2: الاستجابة المناعية Immune response

تؤدي الإصابة بطفيلي *Giardia lamblia* إلى تحفيز نوعين من الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية (Adam,1991). وذكر(1980) Owen أن الخلايا المتوافرة في الصفيحة الوسطية Lamina propria للأمعاء لها القدرة على أنتاج حوالي 300 ملغم من الخلايا المناعية في اليوم الواحد مما يؤدي إلى زيادة في أعداد الخلايا اللمفاوية عند الإصابة بالطفيلي, فيما تتمثل الاستجابة الخلطية بارتفاع مستويات أصناف معينة من الأضداد المناعية (IgA , IgG ,IgM) في مصل الأشخاص المصابين. وعند وصول الطفيلي إلى النسيج الطلائي للأمعاء فان خلايا البلعم الكبيرMacrophage تقوم بابتلاعه بعد تعرف جهاز المناعة عليه وتمييزه كجسم غريب Antigen إذ تعمل هذه الخلايا على قتله والتخلص منه (Owen *et al.*, 1981 ; غندور وجماعته, 2008), وقد أجريت العديد من الدراسات على القوارض (كالفئران والجرابيع) لفهم آلية حدوث الاستجابة المناعية ضد هذا الطفيلي, وقد أوضحت هذه الدراسات أن بإمكان الفئران إنهاء الإصابة التجريبية بعد مرور 3-4 أسابيع من الإصابة. كما أن الطفيلي يصل إلى ذروة وجوده في المضيف في الأيام 14- 7, ثم يبدأ تدريجياً بالتناقص في الأسبوعين التاليين. تبين أيضا أن الفئران لا تصاب بالطفيلي عند تعريضها إلى إصابة ثانية وان الفئران الحوامل تستطيع طرد الطفيلي إذا ما كانت أعداده قليلة (Roberts-Thompson *et al.*, 1976a,b ; Stevens and Frank, 1978). يرافق وجود الطفيلي في الأمعاء ظهور تغيرات نسيجية كزيادة ارتشاح الخلايا الالتهابية Infiltrate of inflammatory cells في طلائية الأمعاء فضلاً عن تضخم خبايا الأمعاءCrypt hypertrophy وتثلم الزغابات Villous blunting وتسطحها. وقد توافقت الدراسات التي أجريت على الفئران مع تلك التي أجريت

على الإنسان ففي دراسة أجريت من قبل Rendtorff (1954) أكد أن معظم الأشخاص الذين تعرضوا للإصابة التجريبية بالجيارديا تم شفاؤهم ذاتياً بعد 18 يوماً من الإصابة. كما أن هناك أدلة عن حصول تمنيع غير كامل للإصابة اللاحقة بالجيارديا من خلال بعض الدراسات الوبائية, فقد وجد أن الأشخاص الذين يعيشون في مناطق موبؤة كمناطق الجبال في أمريكا الشمالية تكون نسبة الإصابة عندهم منخفضة مقارنة بأولئك الذين وصلوا حديثاً للمنطقة, وان نسبة الإصابة في الدول النامية تكون عالية في الأشخاص الأصغر عمراً كالأطفال مقارنة بالأعمار الأخرى لاحتمالية تعرض الأشخاص الأكبر عمراً إلى إصابة سابقة أدت إلى تطور الاستجابة المناعية ضد هذا الطفيلي (Miotti *et al.*, 1986 ; Mahmud *et al.*, 1995). كما وجد أن التغيرات النسيجية التي تحدث في أنسجة الحيوان قد تحدث عند الإنسان أيضا كارتشاح الخلايا الالتهابية وتضخم الخبايا وتثلم الزغابات .

ومن خلال الدراسات على مقاطع المجهر الالكتروني وجد أن كلا نوعي الاستجابات المناعية الخلوية والخلطية (Cellular and Humoral) تتداخل عند حدوث الإصابة بطفيلي الجيارديا, وقد أشارت هذه الدراسات توافر الطفيلي داخل الخلايا البلعمية مما يدل على مساهمة هذه الخلايا في القضاء على الطفيلي (Owen *et al.*, 1981 ; Hill and Pohl, 1990 ; Hjelt *et al.*, 1992), كما وجد أن الخلايا اللمفية التائية المساعدة T helper cells تسهم في الاستجابة المناعية ضد هذا الطفيلي, وتساعد على توليد الأجسام المضادة نوع A (IgA) (Heyworth, 1989). وتبين أن إفراز هذه الأجسام المضادة مرتبط مع عملية التخلص من الطفيلي وان سرعة عملية طرد الطفيلي وكفائتها تقل في حالة عدم وجود هذه الأجسام, كما في الفئران التي ثبطت فيها عملية تكوين هذه الأجسام المضادة (Heyworth, 1989), حيث يعمل IgA على منع التصاق الجيارديا بسطح الطلائية (Jones and Brown, 1974 ; Holberton, 1973) .

وقد عدّت بعض الدراسات والتي أجريت من قبل Byrd وجماعته (1994) و Nash (1997)و Stager and Muller (1997) الجيارديا من الطفيليات التي بإمكانها مراوغة الجهاز المناعي للمضيف لوجود بروتينات سطحية تغطي سطح الجيارديا والتي تتغير باستمرار سواء كان ذلك في الأنواع المستزرعة أو تلك المعزولة من جسم المضيف (الإنسان أو الحيوان), ويعتقد أن هذه البروتينات ساعدت الجيارديا على البقاء, وحماية الطفيلي من الفعاليات الأنزيمية والهروب من الجهاز المناعي(Wang *et al.*,, 2007) .

8.2: عوامل الضراوة Virulence factors

اشتق مصطلح Virulenceمن كلمة لاتينية الأصل Virulentus وتعني سام Toxic أو ملئ بالسم Full of poison. ويشمل هذا المصطلح معاني كثيرة فيما يتعلق بالكائنات الدقيقة Microorganisms فقد يعني قدرة الكائن الحي على التكاثر داخل المضيف فضلاً عن قدرته على الانتقال لإصابة مضائف جديدة (Casadevall and Pirofski, 2001) .

ومن المعاني الكلاسيكية لمصطلح الضراوة (الفوعة) هي السمية Toxicity أو القدرة على إنتاج السم من قبل الكائن الدقيق, والذي يؤدي إلى التسبب بالأذى للمضيف (Casadevall and Pirofski, 2001), وقد وجد أن العديد من البكتريا لها القدرة على إفراز سموم معينة مسببة في أحداث المرض في مضائفها كبكتريا *Bacillus* spp. و *Escherichia* spp. و *Bacteriodes* spp. (Wick and Sears, 2010). وتشير الدراسات إلى انعدام هذه الصفة في الجيارديا لافتقارها إلى الجين الذي يعبر لإنتاج هذه السموم, مع أن هناك دراسة أشارت إلى توافر جزيئات شبيهة بالسم enterotoxin - like molecule ذات وزن جزيئي 58KD تحفز على تفعيل المسارات الايضية التي تؤدي إلى تراكم السوائل في الأمعاء وزيادة إفراز الايونات (Kaur *et al*., 2001). وفيما يتعلق بالطفيلي فقد يشير مصطلح الضراوة إلى قدرة الطفيلي على تكوين أعداد كبيرة من الأكياس والتي تساعده على زيادة الانتشار وأحداث إصابة جديدة في مضائف جديدة (Knaippe, 1990). فضلاً عن ذلك فقد يشير إلى القدرة على الالتصاق والتي تعد صفة مميزة لطفيلي الجيارديا نظراً لوجود قرص الالتصاق (Holberton, 1973) أو وجود اللكتين Lectin السطحي أو الجياردين giardin أو البروتينات المتغيرة الخاصة التي تتداخل في عملية الالتصاق هذه (Sousa *et al*., 2001 ; Jenkins *et al*., 2009 ; Bermudez-Cruz *et al*., 2004) وتعد الاسواط من عوامل الضراوة لطفيلي الجيارديا والتي تلعب أيضاً
دوراً مهماً في عملية الالتصاق (Adam, 2001).

لقد وجد إن جنس الجيارديا *Giardia* الذي يصيب البشر و اللبائن يضم نوعين جينيين هما A وB (Lim *et al*., 2011). وقد بينت دراسات عديدة على قدرة هذين النوعين في التسبب بظهور أعراض مرض داء الجيارديات في الإنسان, فيما اختلفت هذه الدراسات في تحديد أي النوعين اشد ضراوة من الآخر وفي قوة إظهار المرض (Feng and Xiao, 2011). فبينما تشير دراسة الباحثان Homan and Mank (2011) إلى إن النوع B أظهر ضراوة اكبر من النوع A في المرضى المصابين بالإسهال, وجدت دراسة الباحث Read وجماعته (2002) إن النوع A هو الأكثر ضراوة في إحداث المرض وذلك بتسببه بحصول عدد مرات إسهال أكثر في المرضى المصابين بالجيارديا.

في حين أشارت دراسة الباحث Mohammed-Mahdy وجماعته (2009) إلى عدم وجود اختلاف في شدة ضراوة المرض بين النوعين, وقد اتفقت هذه الدراسات على ضرورة إجراء المزيد من البحوث لتحديد الأنواع الأكثر ضراوة بالنسبة لجنس الجيارديا .

9.2 : التشخيص Diagnosis :

1.9.2 : الطريقة المباشرة Direct Method :

يعتمد تشخيص الإصابة بطفيلي *Giardia lamblia* على ظهور العلامات السريرية. ولكن التشخيص الدقيق يتم بأجراء الفحوصات المختبرية الخاصة للكشف عن الأكياس والأطوار الخضرية للطفيلي ومنها طريقة الفحص المباشر Direct examination method) Mahbubani *et al.*, 1992 ; Younas *et al.*, 2008 ; Ellam *et al.*, 2008) وذلك بأخذ مسحات رطبة من عينات براز المرضى ويضاف إليها قطرات من المحلول الملحي الفسلجي, وتمزج جيداً وقد يتم تصبيغها باليود ثم تغطى الشريحة بغطاء الشريحة, ومن ثم تفحص تحت المجهر الضوئي (Flanagan, 1992 ; Marquardt *et al.*, 2000), أو قد تستعمل إحدى طرائق التركيز لتشخيص الطفيلي كطريقة التطويف باستعمال كبريتات الخارصين أو محلول ملح الطعام أومحلول السكر (Ballweber, 2001) أو طريقة الترسيب باستعمال الفورمالين – أيثر اسيتيت للكشف عن أكياس الطفيلي في البراز (Marquardt *et al.*, 2000 ; Erdman, 1981). ونظراً لتفاوت كمية طرح الطفيلي في البراز لذا فإن عدم مشاهدته في المرة الأولى لا يعني عدم وجوده (الكواز, 1992) حيث أن حساسية الفحص لنموذج البراز الواحد تكون منخفضة بنسبة 50– 70% (David *et al.*, 2011) لذلك يتم تكرار الفحص مرتين أو ثلاث مرات لمدة ثلاثة أيام متتالية عند الأشخاص المشتبه بهم لزيادة حساسية الفحص إلى 85-90% (Schuurman *et al.*, 2007 ; Younas *et al.*, 2008 ; Satoskar *et al.*, 2009) .

2.9.2 : الطرائق المناعية Immunological methods :

لقد تم تطوير طرائق مناعية عديدة لتشخيص الجيارديا منها طريقة الفحص المجهري للأجسام المضادة المتألقة المناعية Immuno Fluorescent antibody microscopy (IFA) وطريقة قياس الأنزيمات Enzyme immune assays (EIA) (Mank *et al.*, 1997) إذ تعتمد طريقة IFA على التعليم بوساطة الأجسام المضادة المتألقة الممنعة من خلال تفاعلها مع أكياس الجيارديا

(Garcia and Shimiza, 1997) وتكتسب هذه الطريقة أهمية في تشخيص الطفيلي في العينات المأخوذة من البيئة والغذاء. أما الطريقة الثانية EIA فتعتمد على التفاعل بين المستضدات (الطفيلي) وعلى الأنزيمات المناعية الممنعة, وهذه الطريقة تمتلك حساسية عالية في التشخيص تصل إلى 95 % (Al-Saeed and Issa, 2010 ; Behr *et al.*, 1996). وقد استخدمت أيضاً طريقة الكشف عن أضداد *Giardia* في المصل والمتمثلة بالكشف عن الضد IgM, والتي تعد من الوسائل الشائعة الاستخدام لتشخيص الجيارديا في مصول الأشخاص وهي تستعمل في الدراسات الوبائية لدقتها وكفائتها, كما أنها تسمح باختبار أعداد كبيرة وبسرعة ووقت أقل (Janoff *et al.*,1989 ; Tasic *et al.*, 2008).

3.9.2 : التشخيص بالطريقة الزرعية Identification by Cultures Media

وهي من وسائل التشخيص المؤكدة للإصابة بطفيلي الجيارديا , حيث يتم عزل الطفيلي من عينات البراز ومن ثم تتم زراعته على أوساط زرعية خاصة خارج الجسم الحي وخاصة الطور الخضري (Gasser *et al.*, 1987) أو يحضن أو يجرع إلى الحيوانات المختبرية كالفئران (Isaac-Renton *et al.*, 1999). إذ نجح Meyer (1976) في عزل وتكثير الطور الخضري للطفيلي. وبين الكبيسي (2007) إن هناك مجموعة من الأوساط الزرعية التي تستخدم لتشخيص الطفيلي وعزله كالوسط الزرعيTPS-1, والوسط الزرعي HSP-1 والوسط الزرعي TYl-S-33 المحورّ وبينّ أن أكفأ هذه الأوساط الزرعية هو الوسط الزرعي TYl-S-33 المحور.

4.9.2 : الطرائق الجزيئية Molecular Methods :

كانت تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) تستخدم في تسعينات القرن الماضي بوصفها اختبارات استقصائية متممة, ولكن في نهاية القرن العشرين بدأت هذه التقنية تحل محل تقنيات كثيرة أخرى لأنها أثبتت فعالية كبيرة ودقة ممتازة. وفي مطلع القرن الحادي والعشرين وبعد إتمام سلسلة الجينوم البشري أصبح ينظر إلى كامل هذا القرن بأنه قرن الجينومات Genomics, إذ كان لتقنية PCR دوراً أساسيا في هذه الثورة العلمية الكبرى (Marquardt *et al.*, 2000 , David *et al.*, 2011) .

هي تقنية مختبرية يعتمد أساس عملها على إكثار نسخ الحامض النووي DNA خارج النظام الحيوي (أي أنها طريقة لنسخ الحامض النووي في المختبر) ولذلك فهي تقنية حيوية لاستنسال قطعة

محددة من الحامض النووي ومضاعفة أنتاجها للقيام بالتجارب والفحوصات المختلفة (Markell *et al.*, 1999 ;Nash *et al.*, 1985). ومن أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقنية على الانتشار عدم اعتمادها على النظام الحيوي والتحكم بكمية DNA (Marquardt *et al.*, 2000).

إن التغاير في فترة طرح أكياس الطفيلي قد تؤدي إلى خطأ في التشخيص المجهري ولهذا تتكرر هذه العملية أكثر من مرة للتأكد من توافر أو عدم توافر الإصابة في الأشخاص المفحوصين (David *et al.*, 2011). وتعد طريقة PCR من الطرائق ذات الحساسية العالية نظراً لقدرتها على تشخيص الإصابة حتى في حالة وجود طفيلي واحد في نموذج البراز المفحوص؛ ولهذا تعد هذه الطريقة من الطرائق المفضلة في الدراسات الوبائية (David *et al.*, 2011 ; Satoskar *et al.*, 2009).

أجريت العديد من الدراسات على التشخيص الجزيئي للجيارديا في الإنسان والحيوان ومن هذه الدراسات, الدراسة التي أجراها الباحث Nikaeen وجماعته (2003) لبيان حساسية طريقة PCR حيث أظهرت نتائج الدراسة بأن طريقة PCR تكون أكثر حساسية للكشف عن أكياس الجيارديا مقارنة بالفحص المجهري, كما أظهرت النتائج أمكانية استخدام PCR للكشف الحساس عن الجيارديا في مصادر الماء. وفي الدراسة التي أجراها الباحث McGlade وجماعته (2003) عن الانتشار العالي للجيارديا المكتشف في القطط حيث أظهرت النتائج حساسية عالية عند الفحص بطريقة PCR وبنسبة 80% مقارنة بالفحص المجهري بنسبة 5 % والاليزا بنسبة 60% .

وأوضح الباحث Verweij وجماعته (2004) في دراسة للكشف عن *Entamoeba histolytica* , *Giardia lamblia* , *Cryptosporidium parvum* في عينات البراز باستخدام طريقة Real-Time PCR أن استخدام هذه الطريقة في التشخيص المختبري سوف يزود التشخيص الدقة والحساسية العالية لتشخيص إصابات الإسهال الطفيلية مقارنة بالفحص المجهري. ولبيان حساسية الفحص بطريقة PCR أجرى الباحث Marangi وجماعته (2010) دراسة للكشف عن أكياس *Giardia lamblia* لعينات براز مأخوذة من البشر والحيوانات وأظهرت نتائج الدراسة أن طريقة PCR كانت أكثر حساسية من الفحص المجهري في كل من عينات البشر والحيوانات. وفي الدراسة التي أجراها الباحث El-Badry وجماعته (2010) للمقارنة بين ثلاث طرائق (فحص البراز المباشر, وطريقة الاليزا وطريقة PCR لعينات مأخوذة من الأمعاء بالشفط) بينت الدراسة حساسية الطريقتين الثانية والثالثة (الاليزا و PCR) وسرعتها وخصوصيتها مقارنة بالفحص المباشر.كما تم تشخيص طفيلي الجيارديا من عينات البراز المأخوذة من أشخاص مصابين بالإسهال, وأشخاص ليس لديهم إسهال, وذلك في بحث قام به (Alam *et al.*, 2011) ومن تتبع الدراسات أعلاه يلاحظ أهمية

هذه الطريقة في تشخيص الطفيليات على الرغم من كلفتها فحساسيتها العالية ودقتها فضلاً عن سرعتها وإمكانية إجراء التشخيص لعشرات النماذج في كل مرة يجعل منها طريقة ممتازة في التشخيص خصوصاً في الدراسات الوبائية .

10.2: التركيب الوراثي للجيارديا Genetic Structur of *Giardia*

تحتوي الجيارديا على نواتين تضم داخلها التركيب الوراثي للجيارديا , وقد أشارت الدراسات إلى وجود خمسة كروموسومات في كل نواة من نواتي الجيارديا (Ali and Hill, 2003). وقد بين برنامج جينوم الجيارديا الذي بدأ العمل به عام 1998, إن حجم جينوم الجيارديا يبلغ 12×10^7 زوجاً قاعدياً وإن محتوى GC في جينوم الجيارديا يبلغ 46 % (Adam, 2000) .

اعتمدت دراسة جينوم الجيارديا على مقارنة هذا الحيوان السوطي مع بعض الحيوانات الابتدائية الهدبية Ciliates والتي تتشابه مع الجيارديا باحتوائها على نواتين كالبراميسيوم *Paramecium* وحيوان *Tetrahymena*. وعلى الرغم من هذا التشابه في عدد الانويه ألا إن هذين الحيوانين يمتلكان نواتين مختلفتين في الحجم والشكل على العكس من نواتي الجيارديا اللتين تتشابهان بالحجم والشكل (Walls, 2010). مقارنة بالحيوانات الهدبية التي تمتلك نواة صغيرة تقوم بوظيفة التكاثر الجنسي, وأخرى كبيرة تشفر لبروتينات مسؤولة عن تنظيم جميع الفعاليات الأخرى لجسم الحيوان الهدبي, وبهذا فان هاتين النواتين تختلفان في المحتوى الجيني فضلاً عن الاختلاف بالحجم والشكل (Wiesehahn *et al.*, 1984). أما فيما يخص نواتي الجيارديا فقد أثبتت الدراسات أن التشابه لا يقتصر على الشكل والحجم وإنما يمتد ليشمل التشابه بالمادة الوراثية لكلا النواتين, فقد أوضحت الدراسات المبكرة التي أجراها الباحث Wiesehahn وجماعته (1984), أن حدوث التضاعف في كلا نواتي الجيارديا يحدث في الوقت نفسه, كما بينت الدراسات باستخدام بعض الصبغات الخاصة والمواد المعلمة إن لكلا النواتين في الجيارديا نفس المحتوى الوراثي من حيث الكمية والنوعية (Bernander and Svärd, 2001) وإن كلا النواتين فعالتين في الاستنساخ الوراثي (Kabnick, 1990). وأظهر استخدام تقنية التهجين المتألق في الزجاج Fluorescent in sites hybridization تواجد الجينات نفسها في الكروموسومات الخمسة لكلا النواتين (Yu *et al.*, 2002). وقد اتفق معظم الباحثين (اعتماداً على هذه الدراسات) على تطابق النواتين من ناحية التركيب والفعالية الوراثية (Ankarklev, 2012). وعلى الرغم من عدم اكتمال فهم آلية التنسيق بين النواتين لإتمام عملهما في التعبير الجيني لأداء

مختلف الوظائف بما فيها التكاثر إلا إن الباحثين اتفقوا على ضرورة توافر كلا النواتين لأداء تلك المهام (Adam *et al.*, 2010 ; Walls, 2010).

إن جينوم الجيارديا يحتوي على 6470 قالب قراءة Open reading frames وإن الاستنساخ يتم لحوالي 4787 منها وإن المسافة بين الجينات Intergenic distance تبلغ 372 زوجاً قاعدياً (Yu *et al.*, 2002). لقد وجد إن جينوم الجيارديا مشابه من حيث الحجم لخميرة *Saccharomyces cerevisiae*, وإن هذا الجينوم (كما في بقية حقيقية النواة Eukaryotic) مسؤول عن بناء DNA, وانقسام الخلية, والاستنساخ, وعن عمل RNA فضلاً عن بعض وظائف الجهاز الهيكلي للخلية (Walls, 2010). كما إن هذا الجينوم يحتوي على جينات تشفر لإنتاج أنزيمات ايضية مختلفة (Ankarklev, 2012 ; Lalle, 2010).

1.10.2: المجاميع الجينية للجيارديا Assemblages of *Giardia*

استخدمت العديد من التقنيات لتحديد الأنواع أو السلالات أو المجاميع الوراثية لجنس الجيارديا, فقد استخدمت تقنية تحليل الحزم الإنزيمية Zymodem analysis (Bertram, 1983) وتقنية تباين أطوال قطع التقييد Ristriction fragment length polymorphism analysis (Nash *et al.*, 1985) وتقنية تحديد تسلسل الجينات المختلفة Sequence analysis of virous genes (Teodorovic *et al.*, 2007 ; Baruch *et al.*, 1996) سواء ضمن مجتمع الدراسة أوالمجتمعات المعزولة, وقد أشارت هذه الدراسات إلى وجود ثمانية أنواع جينية لجنس الجيارديا وضعت تحت مسماة المجموعة Groups أو Assemblages اعتمادا على تركيبها الجيني (Walls, 2010). كما إن هذه المجاميع أعطيت أسماء ابتداءً من A وحتى H (Souza *et al.*, 2007 ; Monis *et al.*, 2009). حيث يصيب النوعين A وB الإنسان والعديد من اللبائن, فيما يصيب النوعي C وD الكلاب والقطط والذئاب (Thompson and Monis, 2004). أما النوع E فيصيب الجمال, والأغنام, والماعز, والخنازير ويقتصر النوع F على إصابة القطط فيما يصيب النوع G الجرذان, وقد وجد أخيراً إن حيوانات الماشية تصاب بالنوع H (Monis *et al.*, 2009). إن النوع *Giardia lamblia* (*G. duodenalis*) يضم المجاميع A وB ويصيب مدىً واسعاً من اللبائن فضلاً عن الإنسان مما يشير إلى إن هذا النوع يعد من الأنواع المشتركة بين الإنسان والحيوان على حد سواء Zoonoses (Lim *et al.*, 2011 ; Lalle *et al.*, 2007) . وقد أشارت الدراسات الحديثة إلى إمكانية حصول اتحادات Recombination بين أفراد النوع الواحد مما يؤدي إلى ظهور أنواع ثانوية (Feng and Xiao, 2011), حيث أشارت المسوحات المعتمدة على الطرائق الجزيئية

الحديثة إلى توافر أنواع ثانوية للنوعين A و B في النماذج المعزولة من الحيوانات (Caccio *et al.*, 2009). كما أشارت هذه المسوحات انه على الرغم من هذا فان النوع B أظهر انتشاراً أعلى بين البشر من النوع A (Feng and Xiao, 2011 ; Foronda *et al.*, 2008).

11.2 : تأثير الطفيلي في بعض المعايير الكيموحيوية

Effect of Parasite on Some Biochemical Markers

أثبتت العديد من الدراسات وجود علاقة وثيقة بين الإصابة بالطفيليات المعوية والحالة التغذوية للمصابين بهذه الطفيليات, فضلاً عن تأثير هذه الطفيليات في امتصاص بعض المواد الضرورية لأداء الفعاليات الحيوية لمضائفها (Muniz-Junueira and Oliveira-Queiroz, 2002). وقد أشارت العديد من الدراسات إلى وجود علاقة بين الإصابة بطفيلي الجيارديا وحدوث سوء الامتصاص وسوء التغذية وخصوصاً عند الأطفال (Muniz-Junueira and Oliveira-Queiroz, 2002 ; , 2009 ; Botero-Garcès *et al.*, 2011 El-Sayad *et al.*). ويتسبب الطفيلي بأحداث الإسهال الذي يترافق مع نقص في الحالة التغذوية للمصابين, وأشارت الدراسات إلى وجود أدلة على حدوث نقص في بعض المواد الغذائية فضلاً عن المعادن الضرورية للإنسان كحدوث نقص في بعض الفيتامينات Vitamins كفيتامين A, فيتامين B12, والعناصر المعدنية البروتين Protein,واللاكتوز Lactose, الخارصين, المنغنيز Manganese, والمغنيسيوم Magnesium وغيرها من المواد الضرورية بالنسبة للمضيف (El-Sayad *et al.*, 2011) .

تعد الكاربوهيدرات والبروتينات والدهون والحديد من العناصر التي تلعب دوراً مهماً في الفعاليات الايضية Metabolism للجيارديا, وقد أثبتت الدراسات حاجة هذا الطفيلي لهذه العناصر والمواد الغذائية لنموه وبقائه (Jarroll and Paget, 1995). ومن هنا جاء تفضيل هذا الطفيلي للأمعاء واستيطانه فيها (El-Sayad *et al.*, 2011). ويمثل استهلاك الطفيلي لهذه المواد فضلاً عن قدرته على منع امتصاصها عاملاً مهماً في أحداث نقص قد يصل إلى درجة إحداث حالة سوء التغذية للمضيف (Botero-Garcès *et al.*, 2009).

ونظراً لعلاقة الجيارديا ببطء نمو الأطفال وحدوث نقص التغذية وفقر الدم لدى الأشخاص المصابين فقد توجهت الدراسات لبيان هذه العلاقة ندرج من هذه الدراسات مايلي : الدراسة التي أجريت عام 2003 من قبل الباحث Demirci وجماعته لقياس مستويات الحديد, الزنك والنحاس وعملية أكسدة الدهون Lipid peroxidation في الأطفال المصابين بداء الجيارديات المزمن, وأظهرت النتائج انخفاض في مستويات الحديد والزنك في المصابين مقارنة بمجموعة السيطرة بينما لم

تظهر أي اختلافات في مستويات النحاس في الأشخاص المصابين . وأشار الباحث Baghaei (2003) إلى إمكانية حدوث انخفاض في مستوى البروتين نتيجة الإصابة بالجيارديا. كما تم إجراء الاختبارات الكيموحيوية على بعض الحيوانات المختبرية المصابة بالجيارديا ففي دراسة أجريت من قبل الباحث Cheeramakara وجماعته (2004) على الجرذان لقياس مستويات الهيموكلوبين Hemoglobin وحامض الفوليك Folic acid, وفيتامين B12 أظهرت نتائجها وجود انخفاض في مستوى الهيموكلوبين فيما لم يحدث تغيراً ملحوظاً في تراكيز فيتامين B12 وحامض الفوليك في الجرذان المصابة مقارنة بتلك غير المصابة . وقد تمت دراسة التغيرات في مستوى الأنزيمات الكبدية الأساسية ونسبة البروتين الكلي للأطفال المصابين بالإسهال نتيجة أصابتهم بالجيارديا وظهر أن مستويات الأنزيمات الكبدية كانت أعلى وبصورة معنوية مما عليه في مجموعة السيطرة وإن البروتين الكلي قد أنخفض في المصابين مقارنة بمجموعة السيطرة (Al-Jebory, 2005).

كما أجرى الباحثان Monajemzadeh and Monajemzadeh (2008) دراسة لمقارنة لمستوى الحديد في مصول المصابين بالجيارديا وبعض المعايير المتعلقة بالدم قبل وبعد المعالجة, وقد لوحظ حدوث فقر دم ناتج عن نقص الحديد في المرضى المصابين بالجيارديا. وأجريت دراسة في السليمانية لبيان نسبة الإصابة بالجيارديا وتأثيرها في بعض القيم الكيموحياتية, حيث تسببت الإصابة في حدوث انخفاض نسبة الألبومين Albumin, والكلوبيولين Globulin والكوليسترول مقارنة بالسيطرة (Al-Taie and Ali, 2009). وأوضح الباحث Kilic وجماعته (2010) ارتفاع مستويات النحاس في الأشخاص المصابين بالجيارديا وبصورة معنوية مقارنة بالأشخاص غير المصابين .

في دراسة قام بها الباحث El-Sayad وجماعته (2011) لقياس مستويات المغنيسيوم, الحديد, المنغنيز, النحاس, الكروم Chromium, Vitamin E, الألبومين, البيليروبين Bilirubin وحامض اليوريك Uric acid, إذ أظهرت النتائج انخفاضاً في مستويات كل من المغنيسيوم والحديد والمنغنيز والكروم وفيتامين E في المرضى المصابين بالجيارديا بينما كان لديهم مستويات عالية بالنسبة للنحاس وحامض اليوريك, ولم تظهر مستويات الألبومين, والبيليروبين أي اختلافات في المرضى المصابين بالجيارديا مقارنة بغير المصابين .

12.2 :الوبائية Epidemiology

يعد طفيلي الجيارديا عالمي الانتشار, فقد سجل انتشاره في مناطق عديدة من دول العالم سواء المتقدمة منها أو النامية, ففي البلدان النامية في أسيا, وأفريقيا وأمريكا اللاتينية هناك 200 مليون

شخص تظهر عليهم أعراض داء الجيارديات (Foronda *et al*., 2008 Ibrahim *et al*., 2007 ; Helmy *et al*., 2009 ;) وقد يصل العدد إلى 280 مليون شخص مصاب بهذا الطفيلي (Molina *et al*., 2007), فيما تذكر منظمة الصحة العالمية أن هناك 500000 حالة جديدة يتم الإبلاغ عنها كل سنة على المستوى العالمي (Almeida *et al*., 2010a). وتشير دراسات منظمة الصحة العالمية إلى أن جميع الأطفال في البلدان النامية قد يكونوا معرضين للإصابة بالطفيلي في إحدى مراحل حياتهم (WHO , 1987).

تحصل الإصابة أما بصورة مباشرة عن طريق التماس بين الشخص المصاب وغير المصاب أو عن طريق تلوث الأيدي بأكياس الطفيلي من البراز, أو بصورة غير مباشرة والتي تحدث بشرب الماء وتناول الطعام الملوث بالأكياس (Ali and Hill, 2003 ; Amaral *et al*., 2006 ; Teixeira *et al*., 2007 ; Ejiofor *et al*., 2011), و يعد الماء من العوامل المهمة التي تساعد في انتشار المرض وهو احد الطرائق الرئيسة لاكتساب الإصابة وخصوصاً في البلدان المتطورة اقتصادياً(Huetink *et al*., 2001 ; Laupland and Church, 2005 ; Lalle *et al*., 2007). وأكدت الدراسات إلى أن انتقال طفيلي الجيارديا يحدث من شخص إلى آخر في حالات ضعف العناية بالصحة الشخصية (Mank, 2005 ; Lalle *et al*., 2007 ; Mellingen *et al*., 2010), لذا فان المرض أكثر انتشاراً في الأطفال منه في البالغين وخصوصاً في الأطفال ذوي الأعمار الأقل من خمس سنوات (Ivanov, 2010). وقد ينتقل طفيلي الجيارديا من شخص لآخر في الأماكن المزدحمة كمراكز رعاية الأطفال, المؤسسات, المدارس ورياض الأطفال (Yoeli *et al*., 1972 ; Ejiofor *et al*., 2011), و تحدث الإصابة ضمن أفراد العائلة الواحدة كإصابة الأم في أثناء تبديل حفاظات الأطفال الملوثة (Markell *et al*., 1999), كما ويحدث الانتقال أيضاً بين الذكور الشاذين جنسياً (Levinson and Jawetz, 2000) أو المسافرين إلى مناطق قد تكون موبؤة Cheeramakara *et al*., 2004 ; Dib *et al*., 2008), أو في المرضى الذين لديهم نقص المناعة (Dib *et al*., 2008), أو السباحين في المسابح غير النظيفة لاسيما إذا ما تم ابتلاع كميات كبيرة من مياه هذه المسابح الملوثة (Ejiofor *et al*., 2011). و ينتشر الطفيلي بنسب عالية في الأشخاص ذوي المستوى الاجتماعي والاقتصادي الواطئ حيث يلعب الوعي الثقافي والمستوى المعيشي دوراً في انتشار الإصابة بين الأفراد (Tigabu *et al*., 2010 ; Nkrumah and Nguah, 2011) .

تلعب الحيوانات دوراً مهماً في انتقال المرض فقد تكون مضائفاً خازنةً للطفيلي Reservoir, إذ يعيش الطفيلي في الأمعاء الدقيقة للكلاب, والقطط, والماشية والجرذان (Buret *et al*., 1991 ;

Lee *et al*., 2006) كما وجد في القرود البرية (Salzer *et al*., 2007). وقد أثار توافر الطفيلي في هذه الحيوانات جدال كونه يسبب مرضاً يعد من الأمراض المشتركة Zoonoses بين الحيوان والانسان خصوصاً تلك التي تكون بتماس مباشر معه (Salzer *et al*., 2007), وقد أكدت الدراسات حصول انتقال للإصابة بين البشر, الكلاب, القنادس والفئران ولهذا فان وجود القنادس يعد مؤشراً وبائياً للإصابة بداء الجيارديات في الولايات المتحدة وكندا, وقد عزز هذا الاعتقاد باكتشاف أن مصادر المياه في المناطق التي حصلت فيها الإصابة بالمرض والتي تجهز بالماء من مصادر مياه تأوي حيوان القندس كانت ملوثة بفضلات هذه الحيوانات أكثر من تلوثها بفضلات الإنسان وهذا ما يؤكد أمكانية حصول انتقال الإصابة من الحيوانات إلى البشر (Meyer and Jarroll, 1980 ; ; Laupland and Church, 2005 Salzer *et al*., 2007).

1.12.2 : انتشار طفيلي الجيارديا

1.1.12.2: انتشار الطفيلي في العالم :

قام الباحثان Collins and Edwards (1981) بفحص 453 عينة براز لأشخاص تراوحت أعمارهم 1-80 سنة في ست قرى تقع وسط جنوب الدومنيكان وقد سجل أعلى نسبة بالسوطي *G. lamblia* وهي0.7 % مقارنة بالطفيليات الأخرى التي سجلت في تلك الدراسة نسب اقل. وفي مسح أجراه الباحث Millet وجماعته (1983) عن انتشار الحيوانات الابتدائية المعوية في 220 عينة براز في ولاية كاليفورنيا وجد أن نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* كانت 23% من بين الطفيليات الأخرى. بينما وجد الباحث Reinthaler وجماعته (1988) أن نسبة الإصابة الكلية بالطفيليات المعوية في 479 عينة براز تم فحصها في ولاية اوغون Ogun جنوب غرب نايجيريا كانت 62 % وكانت نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* 4.2 %.

وأجريت في جزيرة Pemba في تنزانيا دراسة للمقارنة بين منطقتين احدهما حضرية Urban والأخرى ريفية Rural , تم فيها فحص 256 عينة براز أخذت من تلامذة المدارس, لم تسجل الدراسة توافر فروقات معنوية بين المنطقتين في حين أن نسبة الإصابة بالجيارديا في تلك الدراسة بلغت 6.6% (Albonico *et al*., 1993). كما اجري مسح لمناطق حضرية وريفية في جمهورية الدومنيكان تم فحص 1547 عينة براز للتحري عن وجود الطفيليات, تبين فيها أن أعلى نسبة إصابة كانت بالسوطي *G. lamblia* وبلغت 5.4 % (Miyata *et al*., 1995). وفي دراسة أجريت في

مدينة Sao Paulo في البرازيل, سجلت نسبة إصابة كلية بالطفيليات المعوية بين أطفال المدارس الابتدائية بلغت56.1 %. وقد سجلت نسبة إصابة بالسوطي *G. lamblia* بلغت 10% Dorea *et al*., 1996) .

وفي الولايات المتحدة سجل الباحث Garcia وجماعته (2000) نسبة إصابة للسوطي *G. lamblia* بلغت 38.288%. فيما بلغت نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* في اثيوبيا 6.2%, وذلك في دراسة مسحية أجراها كل من الباحثين Legesse and Erko (2004) عن انتشار الطفيليات المعوية بين تلاميذ المدارس في منطقة ريفية قريبة من المنطقة الجنوبية الشرقية من بحيرة Langano .

ولبيان علاقة الإصابة بالـ *Giardia* مع تلوث الغذاء (الخضراوات) بمياه المجاري, أجريت دراسة من قبل الباحث Oda وجماعته (2005) تم فيها تسجيل نسبة الإصابة بين السكان القاطنين منطقة Hyogo غرب اليابان والتي بلغت 1.3% وأوضحت الدراسة أن هناك علاقة وثيقة بين نسبة الإصابة بالطفيلي وتلوث الخضراوات بمياه المجاري .

وقد أجرى الباحث Saksirisampant وجماعته (2006) دراسة عن انتشار الإصابات الطفيلية المعوية بين تلاميذ المدارس في المنطقة المركزية في تايلند, سجلت نسبة إصابة 1.25% بالسوطي *G. lamblia*. وأجريت دراسة في كشمير تناولت انتشار الطفيليات المعوية وعلاقتها بالعوامل المساعدة على انتشار هذه الطفيليات بين طلاب المدارس في مدينة Srinagar, وقد وجد أن نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* بلغت 7.2% (Wani *et al*., 2007). وفي مسح أجراه الباحث Mehraj وجماعته (2008) عن انتشار الإصابات بالطفيليات المعوية والعوامل المرتبطة بها بين الأطفال في حي حضري فقير في كراتشي Karachi, تم جمع عينات عشوائية من 350 طفل بعمر1−5 سنوات وقد تبين أن السوطي *G. lamblia* هو الأكثر شيوعاً من بين الطفيليات المسجلة. كما أشار الباحث Mumtaz وجماعته (2009) في دراسة أجراها عن العوامل المحددة للإصابة بالطفيليات المعوية في الأطفال تحت عمر خمس سنوات إلى أن السوطي *G. lamblia* كان الأكثر شيوعاً وبنسبة 25.3 % .

وأجريت دراسة من قبل الباحث Rayan وجماعته (2010) عن تأثيرات العمر والموقع الجغرافي في حدوث الإصابات الطفيلية بين طلاب المدارس, تم فيها فحص195عينة براز للطلاب في منطقتين مختلفتين اقتصادياً واجتماعياً في الريف والحضر كانت نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* في الريف 17.9 % و في الحضر14 %.

وقد وجدت دراسة أجريت في كوبا من قبل الباحث Bello وجماعته (2011) أن هناك علاقة وثيقة بين نسبة الإصابة بالـ *Giardia* عند الأطفال (والتي بلغت3.41%) وبين قضم الأظافر وتناول الخضراوات غير المغسولة. وفي مدينة Awka في الجنوب الشرقي لنيجيريا Nigeria أجريت دراسة من قبل الباحث Ejiofor وجماعته (2011) للتحري عن انتشار الجيارديا في الأطفال المصابين بالإسهال والمراجعين للمركز الصحي في تلك المدينة تبين أن نسبة الإصابة الكلية بالجيارديا كانت 10.1% وان أعلى نسبة إصابة كانت في الأطفال بعمر أربع سنوات فأقل حيث بلغت نسبة الإصابة في هذه الفئة العمرية 55.6% .

وبين الباحث Hakim وجماعته (2011) أن نسبة الإصابة بالـ *Giardia* في الأشخاص المصابين بسوء الهضم 7% فيما كانت نسبة الإصابة بهذا الطفيلي في الأشخاص المصابين بالسكر15% وقد تمت أجراء هذه الدراسة في تركيا .

2.1.12.2: انتشار الطفيلي في الوطن العربي :

أنجزت بعض الدراسات للتحري عن الطفيليات المعوية ومنها الجيارديا في عدد من الأقطار العربية وسيتم أدناه التطرق لبعض منها مرتبة حسب قدم نشرها:

قام الباحث El-Naggar وجماعته (1978) بفحص 60 عينة براز لأطفال المدارس وأطفال دون سن المدرسة من المراجعين لمستشفى جامعة الأزهر في جمهورية مصر وسجل نسبة إصابة بالسوطي *G. lamblia* بلغت23.3%. أما في منطقة الباحة في المملكة العربية السعودية فقد تم فحص41 تلميذاً من إحدى المدارس تراوحت أعمارهم بين7-16 سنة وكانت نسبة الإصابة الكلية بالطفيليات المعوية 26.3% وكانت نسبة الإصابة بالسوطي *G.lamblia* 4.8% (Siddiqui, 1981).

وفي مسح ميداني أجراه الباحثان Abdel-Hafez and Abdel-Hafez (1984) في مناطق مختلفة من وادي الأردن كانت نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* 20%. وفي دراسة للتقصي عن وجود الطفيليات المعوية, تم فحص 3817 عينة براز في مستشفى الملك فيصل التخصصي ومركز الأبحاث في الرياض في المملكة العربية السعودية من قبل الباحثان Qadri and Khalil (1987) وكانت النسبة الإجمالية للإصابة بالطفيليات المعوية 27.8% وكانت نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* 13.9%. كما أجريت دراسة من قبل الباحث Khan وجماعته (1989) على مرضى مركز شمسان للرعاية الأولية للتقصي عن مدى انتشار الطفيليات المعوية في مدينة ابها في المملكة العربية السعودية وكانت النسبة الكلية للإصابة 29.4%, وقد كانت معدلات

انتشار الطفيليات أعلى بين الأطفال دون سن العاشرة من العمر وبلغت نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* أعلى نسبة 15.5% من بين الطفيليات المسجلة. وفي دولة البحرين تم دراسة الإصابات الطفيلية بين تلامذة المدارس الذين تراوحت أعمارهم بين 6–11 سنة, إذ أشارت دراسة الباحثان Musaiger and Gregory (1990) إلى وجود انخفاض في بعض الإصابات الطفيلية للمدة مابين عام 1980 وعام 1986 وأوضحت الدراسة أن السوطي *G. lamblia* هو أكثر الطفيليات المشخصة شيوعاً بنسبة 4%. وتم التحري عن الطفيليات المعوية والخارجية من قبل الباحث Morsy وجماعته (1991) بين تلامذة المدارس الابتدائية في مدينة القلّوب Qualyob في محافظة القلّيوبية Qualyobia في مصر, تم فحص 486 من تلامذة المدارس وتبين أن نسبة الإصابة بالسوطي *G.lamblia* كانت9.1%. فيما أجرى الباحث Yassin وجماعته (1999) دراسة عن انتشار الطفيليات المعوية بين طلاب المدارس في قطاع غزة حيث جمع 489 نموذج براز من أطفال المدارس بعمر 6 -11 سنة وكانت طريقة الفحص بطريقة المسحة المباشرة وتقنية التعويم والترسيب, وقد كشفت الدراسة بان نسبة انتشار الطفيليات الإجمالية كانت 27.6% وكان السوطي *G. lamblia* النوع الأكثر وجود بنسبة 62.2 %.

وعن انتشار الطفيليات المعوية وعلاقتها بفقر الدم وحالة التغذية بين تلاميذ المدارس بعمر 6 -11 سنة وجد الباحث Shubair وجماعته (2000) أن النسبة الكلية لانتشار الطفيليات المعوية في غزة كانت 24.5% وكان السوطي *G. lamblia* الأكثر شيوعاً بنسبة 62.2% وقد تركزت الإصابة في المجموعة العمرية 6 -7 سنوات .

وسجل الباحث Sharif (2002) عند دراسته لمدى انتشار الاختلافات الموسمية وتأثيرها في الطفيليات المعوية الشائعة في محافظة خان يونس للفترة بين 1996-2000 نسبة إصابة بالسوطي *G. lamblia* بلغت 22.84%. وبينت دراسة أجريت من قبل الباحثين Srikanth and Naik (2004) في مدينة أسمرة Asmara في ارتيريا Eritrea أن الإصابة بين الفلاحين الذين يكونون بتماس مع المياه الثقيلة المستعملة كسماد للمزروعات كانت 45.3% وأكدت الدراسة على أن استخدام هذه الطريقة في تسميد الخضراوات كان له دور رئيس في ارتفاع نسبة الإصابة. وفي دراسة أجريت أيضاً في المملكة العربية السعودية, تم جمع 63,892 نموذج براز للتحري عن وجود الطفيليات المعوية كان السوطي *G. lamblia* هو الطفيلي المعوي الأكثر انتشاراً بنسبة 48.6% , Alkhalife (2006) .

تم دراسة الإصابات بالطفيليات المعوية بين العاملين في مجال الغذاء في مكة المكرمة خلال موسم حج 1428هجري حيث وجد الباحث Wakid وجماعته (2009) نسبة الإصابة الكلية بالطفيليات المعوية 31.94%, كانت نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* 1.98%. وفي دراسة أجراها Abu-Madi وجماعته (2008) عن أنماط الإصابة بالطفيليات المعوية في قطر بين عاملات وعمال الغذاء من مناطق جغرافية مختلفة, سجلت نسبة أصابه بالديدان 13.6% ونسبة إصابة 24.8 % بالحيوانات الابتدائية وكان من بينها السوطي *G. lamblia* حيث سجل أعلى نسبة انتشار. وجرى فحص731عينة براز أخذت من أطفال مرحلة التعليم الأساسي في11مدرسة موزعة في مدينة حماة في سوريا كان طفيلي *G. lamblia* من ضمن أنواع الطفيليات الممرضة التي شوهدت وبنسبة 5.33% (إسماعيل, 2009). أما في مدينة الرياض في المملكة العربية السعودية فقد أجرى الباحث Al-Megrin (2010) دراسة عن الإصابة بالطفيليات المعوية بين المرضى بنقص المناعة المكتسب إذ تم جمع عينات البراز من 136 مريض باستخدام تقنيات التركيز, و التصبيغ, والفحص المباشر, وسجلت نسبة إصابة بالسوطي *G. lamblia* بلغت 6.6%.

وفي دراسة أخرى أجريت في المملكة العربية السعودية عن انتشار الطفيليات المعوية بين المرضى المراجعين لمستشفى النور كانت نسبة انتشار الطفيليات المعوية 6.2% لـ 740 حالة مفحوصة وكانت نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* 1.3% (Zaglool *et al.*, 2011).

3.1.12.2: انتشار الطفيلي في العراق :

حظيت الدراسات الوبائية بالاهتمام من قبل الباحثين في العراق. كان من بينها الدراسات التي سيتم التطرق للبعض منها والتي تضمنت الإشارة لطفيلي الجيارديا من بين الإصابات الطفيلية المسجلة مع بعض الدراسات المتخصصة بانتشار طفيلي الجيارديا .

ففي دراسة تناولت الإصابات الطفيلية بين تلامذة بعض المدارس الابتدائية في مناطق مختلفة من مدينة كركوك, أفاد الباحث Jassan وجماعته (1986) بان نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* كانت 5.5%. وللتحري عن وجود الطفيليات المعوية بين تلامذة بعض المدارس الابتدائية في منطقتين في محافظة اربيل (كوران وأزادي) شمال العراق فحصت 424 عينة براز وكانت نسبة الإصابة الكلية المسجلة 62.7% وكانت نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* 31.3% وذلك استناداً لدراسة الباحثين Molan and Farag (1989). فيما لاحظ الباحث Al-Dujaili (1993) في دراسة لانتشار الطفيليات المعوية بين تلامذة بعض المدارس الابتدائية في محافظة

كربلاء حيث فحص فيها 1858 عينة براز لتلامذة المدارس في الريف والحضر وقد سجل السوطي *G. lamblia* أعلى نسبة 9.9% مقارنة بباقي الإصابات الطفيلية. وعند التحري عن وجود الطفيليات المعوية بين تلامذة بعض المدارس الابتدائية في مدينة تكريت (Al-Saadi *et al*, 1995) سجلت نسبة إصابة كلية بلغت 19.8% وكانت نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* 3.6%. وفي دراسة عن مسببات الإسهال والعوامل المؤثرة فيه لدى الأطفال دون سن الخامسة من العمر في بعض مناطق محافظة ديالى (جلولاء والسعدية) إذ أشار جاسم وجماعته (1997) لوجود خمسة أنواع من الطفيليات المعوية المرافقة للإسهال جاء في مقدمتها السوطي *G. lamblia* بنسبة 23% .

وتضمنت دراسة مولود وجماعته (1998) مسحاً للطفيليات المعوية بين سكان محافظة ديالى وشملت الدراسة المرضى المراجعين لـ (14) مركزاً صحياً توزعوا في مناطق مختلفة من المحافظة إذ كشفت الدراسة عن نسبة إصابة كلية بلغت 20.1% وكان السوطي *G. lamblia* أكثر الطفيليات انتشاراً بنسبة 11.9%.

أما في الموصل فقد تناول الباحث Al-Izzi (1998) الإصابات الطفيلية المرافقة للإسهال بين أطفال عدد من دور الحضانة وأظهرت النتائج أن أعلى نسبة إصابة للسوطي بلغت 38%. ودرست البياتي (2000) الإصابات بالطفيليات المعوية وبقمل الرأس بين تلامذة سبع مدارس ابتدائية في قضاء الخالص في محافظة ديالى, إذ تم فحص 4017 عينة براز بطريقة الفحص المجهري المباشر وكانت نسبة الإصابة بالسوطي *G. lamblia* 9.3% .

وسجل (الكبيسي, 2000) عند دراسته وبائية الطفيليات المعوية في محافظة بابل نسبة إصابة بلغت 19.27% وهي الأعلى من بين كل الطفيليات المعوية المشخصة .

وتم دراسة انتشار *G. lamblia* بين الأطفال في مدينة دهوك , في شمال العراق من قبل الباحثين Al-Saeed and Issa (2006) حيث فحص 1261 نموذجاً من عينات البراز التي أخذت من الأطفال في مدينة دهوك , شمال العراق , وبلغ معدل انتشار الإصابة بالـ *G. lamblia* 38.5 % .

وفي دراسة عن انتشار داء الجيارديات في الإنسان في محافظة المثنى قام ملاح (2007) بفحص 345 عينة براز من الأشخاص في عمر 2-55 سنة في مواقع الدراسة المختلفة حيث كشفت نتائج الدراسة عن إصابة الأشخاص بالسوطي *G. lamblia* وبنسبة 28.40%. وفي دراسة أجراها الباحثين سعيد وحميد (2010) في محافظة دهوك شمال العراق عن دور أظافر الأيدي والإقدام في

مدى الانتشار والتلوث بالطفيليات المعوية وأطوارها حيث بلغت نسبة الإصابة بأكياس السوطي *G. lamblia* 16.2% .

وفي دراسة أجراها الباحثين صلبي ورشيد (2010) عن الوبائية لمسببات الإسهال الطفيلية للإنسان حيث فحصت عينات البراز لـ 3410 حالة من الحالات المصابة بالإسهال في المستشفى الحسيني العام في منطقة كربلاء ومن خلال نتائج الفحص ألمختبري للعينات وجد أن عدد الحالات الموجبة الناتجة من المسببات الطفيلية هو 514 حالة إذ تبين أن عدد الإصابات بالسوطي *G. lamblia* كان 268 إصابة بنسبة (7.8%). وتمت دراسة انتشار طفيلي الـ *Giardia* وطفيلي *Entamoeba histolytica* بين الأطفال في مناطق الشعلة و الكاظمية لتقييم علاقة بعض العوامل كالجنس والعمر على معدل انتشار الطفيلي حيث بلغت نسبة الإصابة بالـ *Giardia* 10.72% ولم تكن هناك فروقاً معنوية بين الجنسين وبين الفئات العمرية (Jaeffer, 2011) .

وأجريت دراسة من قبل الباحثين Raof and Abdul-Rahman (2011) في مناطق جنوب شرق بغداد شملت البلديات والنهروان والأمين, جمعت خلالها 250 عينة براز من المرضى يستوطنون مناطق جنوب شرق بغداد للتحري عن وجود طفيلي *G. lamblia* و*Blastocystis hominis* سجلت الدراسة نسبة إصابة بطفيلي *Giardia* بلغت 17.5% وكانت أعلى نسبة إصابة في الفئة العمرية 5-10 سنوات .

كما أجريت دراسة شملت شمال بغداد لدراسة معدل انتشار الإصابة بالـ *Giardia* وبيان تأثير بعض العوامل كالجنس, العمر, المهنة وعدد أفراد العائلة في معدل الإصابة بالطفيلي. وقد كشفت الدراسة أن معدل الإصابة الكلية بالطفيلي كانت 11.66% وبينت الدراسة عدم توافر فروق معنوية بين الذكور والإناث. فيما سجلت أعلى المعدلات لدى الأطفال بعمر اقل من 10 سنوات فضلاً عن أن النسبة العظمى من الإصابات كانت في الأشخاص الذين ينتمون إلى عوائل مكونة من 4 - 9 أفراد (Al-Warid, 2012) .

وجمعت 1520 عينة براز من أطفال تراوحت أعمارهم بين شهر– 12 سنة من المراجعين لمستشفى الكاظمية لبيان انتشار الإصابة بالطفيلي *G. lamblia* و *E. histolytica*, إذ بينت هذه الدراسة أن نسبة الإصابة بالـ *Giardia* كان1.77% وكانت هناك فروقاً معنوية بين الفئات العمرية وقد كانت أعلى نسبة للإصابة في الفئة العمرية شهر– 2 سنة (Ibrahim, 2012) .

3 : المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3 .1: المواد والأجهزة المستخدمة Material and Apparatus

3 .1.1: الأجهزة Apparatus

الشركة المجهزة والمنشأ	أسم الجهاز
Biosan (USA)	Autoclave المؤصدة
Mmk (China)	Automatic pipettes الماصات الاوتوماتيكية
Apple (Japan)	Bilirubinometer جهاز قياس البليروبين
Noantico Agulant (Japan)	Blood sample collection tubes أنابيب لجمع عينات الدم
Cell- Dyn Ruby (USA)	Blood Cells Counter عداد خلايا الدم
(Japan)Sony	Camera كاميرا
Kokusan (Germany)	Centrifuge جهاز الطرد المركزي
Qingdao (China)	Cover slip غطاء الشريحة
Helmar(France)	Deepfreez -20 C مجمدة
Eppendorf (Germany)	Eppendrof Biofuge جهازطرد مركزي صغير
Optima (Japan)	Gel electrophoresis apparatus جهازالترحيل الكهربائي للهلام
Labinco (Germany)	Hot plate الصفيحة الحارة
Termaks(Germany)	Incubator الحاضنة
Olympus(Japan)	Microscop مجهر
Slamed (Germany)	Micropipett الماصات الدقيقة
Barnstea ternational(USA)	Oven الفرن الكهربائي
Eppendorf (Germany)	PCR system (Thermocycler) جهاز PCR

Sartorius (Germany)	pH meter مقياس الرقم الهيدروجيني
Toshibia (Japan)	Referigerator الثلاجة
Cecil 2031 (England)	Spectrophotometer جهاز المطياف الضوئي
Sartorius (Germany)	Sensitive balance الميزان الحساس
Termaks (Germany)	Timer المؤقت
Optima (Japan)	U.V. translelume جهازالاشعة فوق البنفسجية
Fanem (Brazil)	Vortex الخلاط
Biosan(USA)	Water bath الحمام المائي

2.1.3: المواد الكيمياوية Chemicals Materials

الشركة المجهزة والمنشأ	المواد
Himedia Laboratories (India)	Absolute ethanol الكحول المطلق
Scharlau (Spain)	Agarose أكاروز
Sigma (USA)	Bovin Serum Albumin ألبومين المصل ألبقري
Himedia Laboratories (India)	Ethidium bromide اثيديوم برومايد
Thomas baker (India)	Ethylen diamin tetra acetic acid (EDTA) المادة المانعة للتخثر
Himedia Laboratories (India)	Hydrochloric acid حامض الهيدروكلوريك
Riedel – De Haen (Germany)	Sodium citrate سترات الصوديوم
Scharlau (Spain)	Sodium hydroxide هيدروكسيد الصوديوم
Himedia Laboratorie (India)	Tris Hydrochloride ترس هيدروكلوريد

3.1.3: عدة التشخيص المختبري Laboratory Diagnosis Kit

الشركة المجهزة والمنشأ	المواد
Spinreact (Spain)	Albumin Kit عدة الألبومين
Randox (Nourthern Ireland)	Calcium Kit عدة الكالسيوم
Genekam Biotechnology AG (Germany)	*Giardia lamblia* Ag PCR kit عدة تفاعل البلمرة
Fortress (United Kingdom)	Iron Kit عدة الحديد
Qiagen (Germany)	QlAamp DNA Stool Mini Kit عدة الاستخلاص
Qiagen (Germany)	100bp DNA Ladder عدة تحتوي على المحلولين الآتيين:- 100bp DNA Ladder Blue / orange 6X loading dye
Spinreact (Spain)	Uric acid Kit عدة حامض اليوريك

2.3: تحضير المحاليل Preparation of Solutions :

1.2.3: محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 %) NaOH :

حضر المحلول طبقاً للطريقة التي وصفت من قبل Cetinkurt and Jurgen (2005) وذلك بإذابة 1غرام من مسحوق هيدروكسيد الصوديوم في 100مل من الماء المقطر, خلط جيداً وعدل pH المحلول إلى 14.

2.2.3: محلول حامض الهيدروكلوريك HCl :

حضر المحلول اعتماداً على الطريقة التي وصفت من قبل Brody and Kern (2004) بإضافة 1 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز إلى 99 مل من الماء المقطر, وخلط جيداً وعدل pH الناتج أو المحلول إلى 1.

3.2.3: TBE-buffer :

حضر المحلول بإتباع الطريقة التي وصفت من قبل Maniatis وجماعته (1982) حيث ذوب 6.3 غم من مسحوق Trishydrochloride في0.41 غم من خلات الصوديوم Sodium acetate و0.29 غم من EDTA في 1000 مل من الماء المقطر, وخلطت جيداً, وعدل pH الناتج إلى 7.8 ومن ثم حفظ عند درجة 4 مْ .

4.2.3: البومين المصل البقري(Bovin Serum Albumin (BSA :

تم تحضيره من إذابة 0.25 غم من BSA في 100 مل من TBE buffer, اخذ 0.1 مايكروغرام/مايكرولتر من BSA وأضيف إلى كل أنبوبة من أنابيب الاختبار الحاوية على عينة DNA ثم بعد ذلك وضعت الأنابيب في جهاز PCR للحصول على وضوح عالي للصورة .

5.2.3: المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline Solution :

ذوب 0.9 غرام من كلوريد الصوديوم NaCl في 900 مل من الماء المقطر, ثم أكمل الحجم إلى1لتر, وعقم باستخدام المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 مْ, وتحت ضغط 15 باوند/انج ولمدة 15 دقيقة, ثم حفظ بدرجة حرارة 4 مْ لحين استخدامه .

6.2.3: صبغة اثيديوم بروملايد Ethidium Bromide Stain :

حضرت الصبغة طبقاً للطريقة التي وصفت من قبل Maniatis وجماعته (1982) وذلك بإذابة 1.5 ملغم من مسحوق Ethidium Bromide في 7.5 مل من دارئ TBE-buffer, وخلط الناتج جيداً ومن ثم حفظ عند درجة 4 مْ .

7.2.3: صبغة اليود Iodine Stain :

تم إذابة 10 غرام من مسحوق ايوديد البوتاسيوم Potasium Iodide في 90 مل من الماء المقطر, ثم أضيف 5 غرام من مسحوق بلورات اليود Iodine crystal, ورج المحلول جيداً حتى تذوب بلورات اليود أكمل الحجم إلى 100مل, ثم وضع المحلول في قنينة داكنة وحفظ بعيداً عن ضوء أشعة الشمس (يستحسن أن يحضر محلول جديد كل أسبوعين) .

3.3: تحضر هلام الاكاروز Agarose Gel Preparation :

حضر بالاعتماد على طريقة Brody and Kern (2004) بإذابة 3 غرام من مسحوق الاكاروز في150 مل من دارئ TBE-buffer باستخدام الصفيحة الحارة Hot plate عند درجة حرارة 100 مْ, وأضيف 750 مايكرولتر من محلول الاثيديوم برومايد Ethidium Bromide إلى الاكاروز وأكمل تركيز الأخير إلى 1.5 ملغم/مل وخلط جيداً ثم برد هلام الاكاروز عند درجة 45-50مْ قبل الاستخدام .

4.3: طرائق العمل Methods :

1.4.3: مجموعات الدراسة Study groups :

اعتمدت الدراسة الحالية في جمع العينات بأسلوب الاختيار غير العشوائي البسيط المعتمد على متغيرات عدة منها : العمر, الجنس, السكن, مصدر مياه الشرب, عدد أفراد الأسرة والتحصيل الدراسي للأبوين أو المفحوصين, واعتماداً على استمارة خاصة أعدت لذلك وملئت بمقابلة المرضى شخصياً أو ذويهم أثناء جمع العينات (ملحق- 1).

أجريت الدراسة في قضاء بعقوبة مركز محافظة ديالى للمدة من آب 2011 لغاية نهاية شهر نيسان2012 وتم فيها فحص657 شخصاً. وقسمت مجموعات الدراسة إلى مجموعتين تألفت المجموعة الأولى من445 مريضاً يعانون من الإسهال كان عدد الإناث في هذه المجموعة 192 تراوحت أعمارهن بين شهر إلى 65 سنة فيما كان عدد الذكور253 وقد تراوحت أعمارهم بين شهر و89 سنة. أما المجموعة الثانية فقد تضمنت 212 من الأشخاص الأصحاء ظاهرياً (تم التأكد من خلوهم من أي أصابه بكتيرية, أو فايروسية, أو طفيلية من خلال فحص البراز, كما تم التأكد من خلوهم من الأمراض عن طريق الاستفسار باستعمال استمارة البيانات (ملحق-1). بلغ عدد الإناث في هذه المجموعة 105 تراوحت أعمارهن بين شهر و65 سنة أما الذكور فقد كان عددهم 107 وتراوحت أعمارهم بين شهر و58 سنة .

2.4.3: جمع العينات Samples Collection :

1.2.4.3: جمع عينات البراز Stool Samples Collection :

جمعت عينات البراز لجميع الأفراد من المرضى المراجعين للمستشفيات والمراكز الصحية التالية : مستشفى البتول التعليمي, مستشفى بعقوبة العام, المستشفى الاستشاري, المركز الصحي في حي المصطفى, ومركز الرعاية الأولية في كنعان, وبواقع ثلاث عينات من البراز لكل فرد حجم كل منها 2 غرام وضعت العينات في أثناء العمل في حاويات بلاستيكية نبيذه محكمة الإغلاق , ونقلت

إلى المختبر تحت ظروف مبردة. أجريت الفحوصات المختبرية اللازمة على النماذج خلال ساعة واحدة من جمعها .

2.2.4.3: جمع عينات الدم Blood Sample Collection :

سحب 10 مل من الدم الوريدي من المشمولين بالدراسة كافة باستعمال محاقن طبية نبيذة بعد تعقيم مكان السحب بالايثانول بتركيز 70%, حيث وضع 2.5 مل من الدم المسحوب في أنبوبة بلاستيكية تحتوي (EDTA) كمانع تخثر, ثم حركت بهدوء لمدة 5 دقائق (لمنع تجلط الدم) استخدمت هذه العينة لغرض فحص صورة الدم الكاملة ووضع المتبقي من العينة 7.5 مل في أنبوبة بلاستيكية ثانية لاتحتوي على EDTA لأجراء الاختبارات الكيموحياتية .

3.4.3: فصل مصل الدم Sepration of Serum :

تركت عينات الدم (الخالية من EDTA) مدة 20 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة حتى تجلط الدم, ثم طردت العينات مركزياً باستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة بالدقيقة لمدة 10دقائق, فصل المصل عن مكونات الدم الأخرى باستعمال ماصة دقيقة ووضع في أنبوبة سعة 10 مل. ثم حفظت الأنابيب الحاوية على المصل بدرجة 20- مْ لحين إجراء الاختبارات عليها.

5.3: فحص صورة الدم الكاملة Whole Blood Film Examination :

استعمل في الفحص2.5 مل من عينة الدم إذ حركت الأنبوبة الحاوية على EDTA بهدوء ووضعت في جهاز عداد خلايا الدم Blood Cell Counter نوع Cell- Dyn Ruby (USA) وذلك لفحص صورة الدم الكلية وبصورة أوتوماتيكية بوساطة هذا الجهاز.

6.3: تشخيص الطفيلي Parasite Diagnosis :

1.6.3: الفحص العياني Macroscopic Examination :

شملت هذه الطريقة وصف الشكل Form والقوام Consistency لنماذج البراز بوصفها طرية خفيفة Soft أو مائية Watery أو صلبة قوية Well-formed حيث يعد ذلك دليلاً على نوعية الكائنات الطفيلية المتوافرة فيه . فالأطوار الخضرية للحيوانات الابتدائية المعوية غالباً ما تتوافر في العينة الطرية الخفيفة , بينما تظهر الأطوار المتكيسة لهذه الحيوانات في العينات الصلبة القوية

بأعداد كبيرة جداً (Kudo, 1966). كذلك تمت ملاحظة فيما إذا كان نموذج البراز دموياً Bloody أو مخاطياً Mucous, إذ أن توافر الدم والمخاط دلالة على حدوث إصابة, لذا تعطى العينات المحتوية على الدم والمخاط عناية خاصة , وفي مثل هذه الحالة يجب اخذ العينة من المناطق المخضبة بالدم والحاوية على المخاط . كذلك يجب ملاحظة كون البراز دهنياً أو لا, فضلاً عن ذلك تمت ملاحظة لون ورائحة Odor النموذج التي قد تكون متعفنة أو فاسدة كرائحة الزرنيخ في الحالات غير الاعتيادية. شمل الفحص العياني أيضاً الكشف عن توافر الديدان الطفيلية , وللتأكد من عدم وجودها تم مزج نموذج البراز مع الماء وتصفيته فقد تتعلق الديدان بالشاش في حال وجودها وبذلك يمكن رؤيتها وتشخيصها (Ichhpujani and Bhatia, 1994 ; الكفري وحربا , 2009).

2.6.3: الفحص المجهري Microscopic Examination :

وقد تم هذا بطريقتين :

1.2.6.3:الفحص المباشر للبراز Direct Stool Examination :

اجري هذا الفحص لكل عينة من عينات البراز إذ تم تحضير شريحة زجاجية Slide نظيفة ووضعت قطرة من المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline (0.85% ملح الطعام) على أحد طرفيها ثم أخذت كمية صغيرة من البراز من أماكن مختلفة من العينة بوساطة عيدان خشبية خاصة Wood sticks ومزجت العينة مع المحلول الملحي الفسلجي, وعلى الطرف الآخر من الشريحة الزجاجية نفسها, وضعت قطرة من محلول اليود, ومزجت مع كمية صغيرة أخرى أخذت من العينة ذاتها. بعد ذلك تمت تغطية الشريحة بغطاء الشريحة الزجاجية Cover slip وفحصت بالمجهر الضوئي تحت قوة التكبير الكبرى 40 X. كرر الفحص مرتين للنموذج الواحد وتم الكشف عن مسببات الإسهال وتسجيلها (Garcia and Ash , 1975) .

2.2.6.3: طريقة التركيز Concentration method :

استخدمت طريقة التطويف الملحي المشبع Saturated salt flotation method وهي طريقة تعتمد على تحويل المحلول إلى كثافة اكبر من كثافة الطفيليات (Faust *et al.*,1970). تتضمن هذه الطريقة مزج غرام واحد من البراز الحديث مع 100 مل من الماء المقطر ومرر المحلول من خلال أربع طبقات من الشاش الطبي لإزالة المواد العالقة الكبيرة. طرد الناتج (المعلق) لمدة دقيقة في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 2300 دورة بالدقيقة ثم سكب الراشح وأضيف حوالي 2 مل من الماء ومزج مع

الراسب. طردت العينة مركزياً مرة أخرى وبالسرعة نفسها, تكرر هذه العملية إلى أن يصبح الراشح صافياً. سكب الراشح وأضيف 2 مل من كبريتات الخارصين إلى حد الفوهة ثم وضع فوقها غطاء الشريحة وتوضع في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة وبسرعة 2300 دورة في الدقيقة. رفع غطاء الشريحة وثبت على شريحة زجاجية نظيفة مع قطرة من اليود وفحص تحت القوة الصغرى ثم الكبرى (Ichhpujani and Bhatia , 1994) .

5.6.3.الفحص الجزيئي Molecular Examination :

1.4.6.3: استخلاص الدنا DNA Extraction :

تم استخلاص الـ DNA من العينات المفحوصة باستخدام عدة الاستخلاص QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen,Germany) حيث أجريت عملية الاستخلاص بالخطوات الآتية :

1- أُخذ 200 مايكرولتر من عينة البراز الطرية Fresh أو المجمدة المخزونة ووضعت في أنبوبة ابندروف Eppendrof tube حجمها 2 مل.

2- أضيف 1.4 مل من Buffer ASL لكل عينة براز, رجت كل أنبوبة لمدة دقيقة واحدة .

3- سخن المعلق لمدة خمس دقائق في 70 مْ .

4- رُجت العينة لمدة 15 ثانية وطردت مركزياً بسرعة 15000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة.

5 – أُخذ 1.2 مل من الطافي ونُقل إلى أنبوبة جديدة حجمها 2 مل وتم التخلص من الراسب.

6- أضيف قرص من InhibitEX إلى كل عينة ورجت مباشرةً وبشكل مستمر لمدة دقيقة أو حتى يذوب القرص بالكامل. ترك المعلق لمدة دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

7- طردت العينة مركزياً بسرعة 15000 دورة في الدقيقة لمدة ثلاث دقائق .

8- تم أخذ كل الطافي ووضع في أنبوبة ابندروف جديدة حجمها 1.5 مل وتم التخلص من الراسب. طردت العينة مركزياً بسرعة 15000 في الدقيقة لمدة ثلاث دقائق .

9- أُخذ 15 مايكرولتر Proteinase K ووضع في أنبوبة حجمها 1.5 مل.

10- أُخذ 200 مايكرولتر من الطافي وأضيف إلى الأنبوبة الحاوية على Proteinase K .

11- أضيف 200 مايكرولتر من Buffer AL ورجت العينة لمدة 15 ثانية .

12- حضنت العينة في 70 مْ لمدة 10 دقائق ثم طردت مركزياً .

13- أضيف 200 مايكرولتر من الايثانول ethanol (96-100) % ورجت العينة ثم طردت مركزياً.

14- أُخذ أنبوب QIAamp spin column (وهو من مكونات العدة المختبرية) ووضع فيه الطافي.أغلق الغطاء وطرد مركزياً بسرعة 15000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة. وضع محتوى أنبوبة QIAamp spin column في أنبوبة جمع حجمها 2 مل وبعد أن تم التخلص من الأنبوبة التي تحتوي على الراشح .

15- فتح أنبوب QIAamp spin column بحذر وأضيف 500 مايكرولتر من Buffer AW1. طردت العينة مركزياً بسرعة 15000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة. وضعت الأنبوبة QIAamp spin column في أنبوبة جمع جديدة حجمها 2 مل وتم التخلص من أنبوبة الجمع الحاوية على الراشح .

16- فتحت أنبوبة QIAamp spin column بحذر وأضيف 500 مايكرولتر منBuffer AW2 ثم طرد مركزياً بسرعة 15000 دورة في الدقيقة لمدة ثلاث دقائق. وتم التخلص من أنبوبة الجمع الحاوية على الراشح. تم وضع أنبوبة QIAamp spin column في أنبوبة جمع جديدة حجمها 2 مل. ثم طردت مركزياً بسرعة 15000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة ومن ثمّ يتم التخلص من أنبوبة الجمع الحاوية على الراشح .

17- نقلت الأنبوبة QIAamp spin column إلى أنبوبة ابندروف جديدة حجمها 1.5 مل وأضيف 200 مايكرولتر من Buffer AE مباشرةً. تركت لمدة دقيقة واحدة في درجة حرارة الغرفة, ثم طردت مركزياً بسرعة 15000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة .

2.4.6.3: اختبار البلمرة PCR :

اجري هذا الاختبار بأتباع الخطوات الآتية :

الخطوة A :

1- تُعلم أنابيب العينات وأنابيب السيطرة الموجبة +ve والسيطرة السالبة –ve .

2- تم إذابة الأنبوبة A الموجودة في العدة المختبرية التشخيصية وأضيف 8 مايكرولتر من محتوياتها إلى كل الأنابيب .

3- أضيف 10 مايكرولتر من الأنبوبة B إلى كل الأنابيب .

4- أُخذ 2 مايكرولتر من DNA المستخلص من جميع العينات بالطريقة السابقة بوساطة الماصة وأضيف الى كل أنابيب العينات دون أضافته إلى أنابيب السيطرة الموجبة +ve وأنابيب السيطرة السالبة –ve , وتم خلط العينات بصورة جيدة .

5- أُخذ 2 مايكرولتر من الأنبوبة D1 المتوافرة في العدة المختبرية التشخيصية وأضيف إلى أنابيب السيطرة الموجبة مع تجنب ملامسة جدار الأنبوبة وخلطت جيداً .

6- أُخذ 2 مايكرولتر من الأنبوبة D2 المتوافرة في العدة المختبرية وأضيف إلى أنابيب السيطرة السالبة وخلطت جيداً .

7- طردت كل الأنابيب مركزياً لمدة 20 ثانية وبسرعة 8000 دورة / دقيقة .

8- تم تشغيل برنامج Thermocycler باتباع البرمجة الآتية لجهاز PCR :

t C°	Time	Cyclers
94 مْ	2 دقيقة للمسخ الأولي لدنا القالب .	1
94 مْ	1 دقيقة لمسخ الدنا القالب .	28
60 مْ	1 دقيقة لارتباط البوادئ بدنا القالب .	
72 مْ	1 دقيقة لاستطالة البوادئ المرتبطة .	
72 مْ	5 دقائق للاستطالة النهائية لشريط الدنا المتضاعف .	1
4	Storage	

تم التأكد من غلق الأنابيب بشكل صحيح قبل بدء البرنامج , كما تم التأكد من أن الأنابيب تكون متصلة بالكتلة المعدنية لجهاز Thermo cycler والتأكد من عدم وجود الهواء .

بعد توقف الجهاز يتم إجراء الآتي :

الخطوة B تتم كالآتي :

1- حضر هلام الاكاروز Agarose 3% في محلول 1x Tris Hydrochlorid Boric EDTA (TBE) (كما في الفقرة 3.3) .

2- أُخذت الأنبوبة E المعلمة (في العدة المختبرية) لاستخدامها في الترحيل الكهربائي .

4 – بعد الانتهاء من خطوات PCR وبعد تحضير الهلام أُخذ 2 مايكرولتر من الصبغة (أنبوبة F) وأضيف إلى كل أنبوبة بما فيها أنابيب السيطرة الموجبة والسالبة, فضلا عن أنابيب العينات المعلمة .

5- أضيف إلى الحفر المتوافرة على جانبي هلام الترحيل 10 مل من الأنبوبة E : 100 زوج قاعدي الموجودة في العدة المختبرية .

6- أضيف 10 مل من الخليط الذي تم تحضيره في الخطوة 4 إلى الحفر المتبقية في الهلام .

7- رحلت العينات كهربائياً لمدة 40 دقيقة وعلى فولتية 80 فولت.

8- وضع الهلام بعد انتهاء الترحيل في محلول صبغة الاثيديوم برومايد 0.5 ملغم/مل لمدة 5–15 دقيقة.

9- تم ملاحظة الحزم تحت أشعة UV باستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية Transelume U.V. على طول موجي 336 نانومتر.

10- تم تصوير الحزم الظاهرة باستخدام الكاميرا .

7.3: الاختبارات الكيموحياتية Biochemical tests :

تم أجراء الاختبارات الآتية :

1.7.3: قياس تركيز الكالسيوم Ca في مصل الدم :

تم إضافة المحاليل الجاهزة في العدة المختبرية وكما موضح في الجدول :

	Blank	Standard	Sample
Sample	-	-	25 مايكرولتر
Distilled water	25 مايكرولتر	-	-
Standard	-	25 مايكرولتر	-
Solution R1	0.5 مل	0.5 مل	0.5 مل
Solution R2	0.5 مل	0.5 مل	0.5 مل

تترك الأنابيب لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة وتقرأ النتيجة في جهاز المطياف الضوئي على الطول الموجي 570 نانومتر ثم بعد ذلك تطبق المعادلة الآتية :

$$\text{Factor (F)} = \frac{\text{Concentration of Standard (Cst)}}{\text{A standard(Ast)} - \text{A blank (Abl)}}$$

$$\text{C oncentration of Sample (Csa)} = \text{A sample (Asa)} - \text{A blank (Abl)} \times \text{F}$$

F: معامل الامتصاصية

Cst: تركيزالمحلول المعياري Standard

Ast: امتصاصية المحلول المعياري Standard

Abl: امتصاصية محلول التصفير Blank

Csa: تركيزالعينة

Asa: امتصاصية العينة

2.7.3: قياس تركيز حامض اليوريك في مصل الدم :

أخذت ثلاثة أنابيب مختبرية وضع في الأنبوب الأول 1.0 مل من (Working Reactivos (WR) تم تحضيره من مزج Buffer R1 الذي يتكون من :

Phosphate pH 7.4	50 ملي مول/لتر
2-4 Dichlorophenol Sulfonato (DCPS)	4 ملي مول/لتر

ومن Enzymes R2 الذي يتكون من :

Uricase	60 وحدة/لتر
Peroxidase (POD)	660 وحدة/لتر
Ascorbate Oxidase	200 وحدة/لتر
4 - Aminophenazone (4 - AF)	1ملي مول/لتر

تم إضافة المحاليل وكما موضح في الجدول :

	Blank	Standard	Sample
WR(ml)	1.0	1.0	1.0
Standard (ml)	-	25	-
Sample (ml)	-	-	25

رجت الأنابيب ووضعت في الحاضنة لمدة 5 دقائق ثم قرأت النتائج في جهاز المطياف الضوئي على الطول الموجي 520 نانومتر, بعدها تم تطبيق المعادلة الآتية :

$$\text{Factor (F)} = \frac{\text{C standard (Cst)}}{\text{A standard (Ast)}}$$

$$\text{C sample (Csa)} = F \times \text{A sample (Asa)}$$

F : معامل الامتصاصية

Cst : تركيز المحلول المعياري Standard

Ast : امتصاصية المحلول المعياري Standard

Csa : تركيز العينة

Asa: امتصاصية العينة

3.7.3: قياس تركيز الألبومين Albumin في مصل الدم :

أخذت ثلاثة أنابيب مختبرية وضع في الأنبوب الأول 1.0 مل من Reagents R تم تحضيره من مزج R الذي يتكون من : Bromcresol green (pH 4.2 , 0.12 ملي مول/لتر) مع Albumin CAL الذي يتكون من:(5غم/ديسي لتر) Albumin aqueous primary standard

تم إضافة المحاليل الجاهزة في العدة المختبرية وكما موضح في الجدول :

	Blank	Standard	Sample
R(ml)	1.0	1.0	1.0
Standard (ml)	-	5	-
Sample (ml)	-	-	5

تترك الأنابيب لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة وبعدها يقرأ في جهاز المطياف الضوئي على الطول الموجي 630 نانومتر, بعدها يتم تطبيق المعادلة الآتية :

$$\text{Factor (F)} = \frac{\text{C standard (Cst)}}{\text{A standard (Ast)} - \text{A blank (Abl)}}$$

$$\text{C sample (Csa)} = \text{A sample (Asa)} - \text{A blank (Abl)} \times \text{F}$$

F : معامل الامتصاصية

Cst : تركيزالمحلول المعياري Standard

Ast : امتصاصية المحلول المعياري Standard

ABl : امتصاصية محلول التصفير Blank

Csa : تركيز العينة

Asa : امتصاصية العينة

4.7.3: قياس تركيز الحديد Iron في مصل الدم :

أخذت ثلاثة أنابيب وضع في الأنبوب الأول 0.5 مل من المصل وفي الأنبوب الثاني 0.5 مل من محلول التقييس Standard وفي الأنبوب الأخير 0.5 مل من Iron Free Water, ووضع في

الأنابيب الثلاثة 0.1 مل منReducting R2 و2.0 مل منBuffer R1 (جاهز في العدة المختبرية). تم إضافة المحاليل الجاهزة في العدة المختبرية وكما موضح في الجدول :

	Sample	Standard	Reagent Blank
Iron Free Water	-	-	0.5 مل
Sample	0.5 مل	-	-
Buffer R1	2.0 مل	2.0 مل	2.0 مل
Reductant R2	0.1 مل	0.1 مل	0.1 مل
Standard	-	0.5 مل	-
Chromogen R3	0.1 مل	0.1 مل	0.1 مل

رجت الأنابيب وقرأت مباشرة في جهاز المطياف الضوئي على الطول الموجي 595 نانومتر وتعد هذه القراءة هي القراءة الأولى, أضيف بعدها إلى الأنابيب الثلاثة 0.1 مل من Chromogen R3 وقرأت في جهاز المطياف الضوئي على الطول الموجي 595 نانومتر وهذه هي القراءة الثانية , ثم طبقت المعادلة الآتية :

$$\text{Factor (F)} = \frac{\text{C standard (Cst)}}{\text{A standard (Ast)} - \text{A blank (Abl)}}$$

R2 – R1 = الناتج

الناتج - Blank = الناتج × F

F : معامل الامتصاصية

R2 : القراءة الثانية

R1 : القراءة الأولى

5.7.3: قياس تركيز البليروبين في مصل الدم Total bilirubin (T.B.S) :

يتم فيه اخذ عينة من المصل في أنبوبة شعرية capillary وسد احد طرفيها بالصلصال وتقرأ العينة في جهاز Bilirubin meter حيث يعطي الجهاز قراءة مباشرة لتركيز البليروبين .

8.3: التحليل الإحصائي Statistical analysis :

تم إجراء التحليل الإحصائي باستخدام اختبار مربع كاي ($Chi\ X^2$) Chi-square واختبار t-test وذلك باستخدام برنامج SPSS الإحصائي فضلاً عن إجراء قياس الحساسية Sensitivity لكلا طريقتي التشخيص المستخدمة في هذه الدراسة وحسب المعادلة الآتية :

$$\text{Sensitivity of the test (حساسية الاختبار)} = \frac{\text{العينات الموجبة بالطريقة المعينة}}{\text{العينات الكلية}} \times 100$$

4. النتائج Results

1.4 : الإصابات المشخصة في الدراسة الحالية :

تبين من نتائج الدراسة الحالية توافر أنواع مختلفة من الإصابات بالطفيليات المعوية والجدول (1) يوضح إعداد المفحوصين وإعداد المصابين وغير المصابين ونسبة الإصابة الكلية بالطفيليات المعوية حيث سجلت الإصابات الطفيلية نسبة 43.8 % .

جدول (1) : النسبة المئوية للإصابة بالطفيليات المعوية بين إفراد العينة المفحوصين .

المفحوصين	المصابين	غير المصابين	النسبة المئوية %
657	288	369	% 43.8

تم تسجيل أعداد الإصابة ونسبها لكلا الجنسين بكل نوع من أنواع الإصابات المشخصة وكما هو مبين في الجدول (2) حيث بلغت نسبة الإصابة بمجمل الإصابات المشخصة 43.8 %. كشف الفحص المجهري عن وجود خمسة أنواع من الإصابات الطفيلية (ثلاثة من الحيوانات الابتدائية واثنين من الديدان) وكانت نسب الإصابة لكل نوع كالآتي: 26.94% لاميبا الزحار *Entamoeba histolytica*, 8.371% للسوطي *Giardia lamblia*, 1.978% لاميبا القولون *Entamoeba coli*, 1.522% لدودة الصفر الخراطيني *Ascaris lumbricoides* , 5.022% للدودة الدبوسية *Enterobius vermicularis* .

جدول (2) : أعداد المصابين والنسب المئوية للإصابة بأنواع مختلفة من الطفيليات المعوية .

نوع الإصابة	عدد المصابين	النسبة المئوية %
Entamoeba histolytica	177	%26.94
Giardia lamblia	55	%8.371
Entamoeba coli	13	%1.978
Ascaris lumbricoides	10	%1.522
Enterobius vermicularis	33	%5.022
المجموع	288	% 43.8

2.4 : بعض الجوانب الوبائية المؤثرة في نسب الإصابة بالجيارديا :

بينت الدراسة الحالية ومن خلال الكشف بوساطة الفحص المجهري إن نسبة الإصابة الكلية بالجيارديا كانت 8.371% وأن نسبة الإصابة بين الذكور كانت 8.356% مقارنة بنسبة الإصابة عند الإناث والتي بلغت نسبة 8.389% وكما موضح في الجدول(3). وبينت الاختبارات الإحصائية عدم توافر فرق معنوي في الإصابات بين الذكور والإناث وعند مستوى احتمالية P value 0.988 إذ كانت قيمة t المحسوبة 0.015 والجدولية 6.314.

جدول (3): أعداد ونسب الإصابة بطفيلي *Giardia lamblia* في الذكور والإناث المفحوصين .

الجنس	عدد غيرالمصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	عدد المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	P value
ذكور	329	% 91.643	30	% 8.356	0.988
إناث	273	% 91.610	25	% 8.389	
المجموع	602	% 91.628	55	% 8.371	

χ^2 الجدولية:3.841 χ^2 (0.05,1)

χ^2 المحسوبة: 0.011

t الجدولية : 6.314 t (0.05 , 655)

t المحسوبة : 0.015

يوضح الجدول (4) علاقة الإصابة بطفيلي *Giardia lamblia* بأعمار الأفراد المفحوصين, وقد بينت النتائج أن أعلى نسبة إصابة 22.857% ضمن الفئة العمرية 18 ≤ 5 ≤ بينما كانت أوطأ نسبة أصابه 6.288% في الفئة العمرية 5≥. ومن خلال الاختبارات الإحصائية وجد إن هناك فرقاً معنوياً بين الفئات العمرية المختلفة وعند مستوى احتمالية بلغت$P < 0.001$.

جدول (4) : علاقة الإصابة بطفيلي *Giardia lamblia* بأعمار الأفراد المفحوصين .

العمر (سنة)	عدد غير المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	عدد المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	P value
≤ 5	462	% 93.711	31	%6.288	<0.001
≥ 5 ≤18	54	% 77.142	16	% 22.857	
≥ 18	86	% 91.489	8	% 8.510	
المجموع	602	% 91.628	55	% 8.371	

χ^2 الجدولية: 5.99 χ^2 (0.05,2)

χ^2 المحسوبة : 21.94

تم بيان تأثير عدد أفراد الأسرة في نسب الإصابة بطفيلي الجيارديا حيث تمت المقارنة بين نسب الإصابة في العوائل التي تتراوح أعداد أفرادها من 4-5 أفراد إلى 14 فرداً فأكثر, وكما موضح في الجدول (5). سجلت أعلى نسبة في الأسرة التي تراوح عدد إفرادها 14 ≤ (12.435%) بينما سجلت أوطأ نسبة في الأسرة التي يتراوح أعدادها 4-5 أفراد (1.923%). ومن خلال الاختبارات الإحصائية تبين توافر فروقات معنوية بين الإصابات ضمن الفئات المختلفة لعدد أفراد الأسرة عند مستوى احتمالية 0.086 .

جدول (5): علاقة الإصابة بطفيلي *Giardia lamblia* بعدد أفراد الأسرة .

عدد أفراد الأسرة	عدد غيرالمصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	عدد المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	P value
5 – 4	51	%98.076	1	% 1.923	0.086
7 – 6	74	% 96.103	3	% 3.896	
9 – 8	90	% 93.75	6	% 6.25	
11 – 10	119	% 91.538	11	% 8.461	
13 – 12	99	% 90.825	10	% 9.174	
≥ 14	169	% 87.564	24	% 12.435	
المجموع	602	% 91.628	55	% 8.371	

χ^2 الجدولية : 15.51 χ^2 (0.05,5)

χ^2 المحسوبة : 39.563

وحول دراسة علاقة مصدر الماء بنسب الإصابة بطفيلي الجيارديا تمت المقارنة بين نسبة الإصابة اعتماداً على مصدر ماء الشرب (إسالة– وبئر– ونهر– وخزان) وقد تبين من النتائج أن أعلى نسبة إصابة كانت ضمن فئة الأفراد الذين يشربون ماء النهر (17.647 %), وأوطأ نسبة إصابة كانت ضمن فئة الأفراد الذين يشربون ماء الإسالة (4.0%) جدول (6). وبينت الاختبارات الإحصائية توافر فرق معنوي عند مستوى احتمالية 0.351 .

جدول (6): علاقة الإصابة بطفيلي *Giardia lamblia* بمصدر مياه الشرب .

مصدر الماء	عدد غير المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	عدد المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	P value
إسالة	24	% 96.0	1	% 4.0	0.351
بئر	510	% 91.397	48	% 8.602	
نهر	14	% 82.452	3	% 17.647	
خزان	54	% 94.736	3	% 5.263	
المجموع	602	% 91.628	55	% 8.371	

χ^2 الجدولية : 7.815 χ^2 (0.05,3)

χ^2 المحسوبة : 14.903

وعند دراسة علاقة نسبة الإصابة بطفيلي الـ *Giardia* بمنطقة سكن الأفراد المفحوصين تبين أن نسبة الإصابة متساوية تقريبا فقد كانت في المدينة 8.280% وفي الريف8.4%. وتبين من الاختبارات الإحصائية عدم توافر فرق معنوي عند مستوى احتمالية 0.962 جدول (7) .

جدول (7): علاقة الإصابة بطفيلي *Giardia lamblia* بمنطقة سكن الأفراد المفحوصين .

السكن	عدد غير المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	عدد المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	P value
ريف	458	% 91.6	42	% 8.4	0.962
مدينة	144	% 91.719	13	% 8.280	
المجموع	602	% 91.628	55	% 8.371	

χ^2 الجدولية :3.841 χ^2 (0.05,1)

χ^2 المحسوبة : 0.002

وقد تمت دراسة علاقة الإصابة بطفيلي الجيارديا مع التحصيل الدراسي للأبوين إذ تمت مقارنة التحصيل الدراسي للأب ونسب الإصابة بالطفيلي, وقد تبين أن أعلى نسبة إصابة كانت عند الأشخاص الذين كان والدهم غير متعلم بنسبة 12.565%. أما أوطأ نسبة إصابة فعند الأشخاص الذين يكون والدهم حاصلاً على الشهادة الجامعية وبنسبة 3.947%, وبينت الاختبارات الإحصائية توافر فرق معنوي عند مستوى احتمالية 0.105 جدول (8).

جدول (8): علاقة الإصابة بطفيلي *Giardia lamblia* بالتحصيل الدراسي للأب .

التحصيل الدراسي للأب	عدد غير المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	عدد المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	P value
أمي	167	%87.434	24	%12.565	0.105
شهادة ابتدائية	260	%93.525	18	%6.474	
شهادة متوسطة	48	%90.566	5	%9.433	
شهادة إعدادية	54	%91.525	5	%8.474	
شهادة جامعية	73	%96.052	3	%3.947	
المجموع	602	%91.628	55	%8.371	

χ^2 الجدولية : 5.58 χ^2 (0.05, 4)

χ^2 المحسوبة : 7.702

أما فيما يتعلق بمستوى التحصيل الدراسي للأم فقد أظهر الجدول (9) أن أعلى نسبة إصابة كانت عند الأشخاص الذين كانت أمهاتهم غير متعلمات بنسبة 11.764%. أما أوطأ نسبة إصابة فعند الأشخاص الذين تكون أمهاتهم حاصلات على شهادة الجامعية وبنسبة 6.043%. وبينت الاختبارات الإحصائية وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية 0.643 . إن ارتفاع نسبة الإصابة يعزى إلى انخفاض المستوى الثقافي للوالدين .

جدول (9) : علاقة الإصابة بطفيلي *Giardia lamblia* بالتحصيل الدراسي للأم .

التحصيل الدراسي للأم	عدد غير المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	عدد المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	P value
أمي	30	% 88.235	4	% 11.764	0.643
شهادة ابتدائية	79	% 89.772	9	% 10.227	
شهادة متوسطة	42	% 89.361	5	% 10.638	
شهادة إعدادية	280	% 91.503	26	% 8.496	
شهادة جامعية	171	% 93.956	11	% 6.043	
المجموع	602	% 91.628	55	% 8.371	

χ^2 الجدولية : 0.08 χ^2 (0.05, 4)

χ^2 المحسوبة: 2.512

3.4 : مقارنة الفحص المجهري بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR :

لأجراء المقارنة بين طريقة الفحص المجهري والفحص بطريقة PCR تم أخذ عينة بلغ عدد أفرادها 19 شخصاً من العينات التي سبق تشخيصها بالفحص المجهري وكان عدد الأفراد غير المصابين في هذه المجموعة 8 بينما بلغ عدد المصابين 11 (مع مراعاة عدم وجود أي إصابة أخرى لأفراد المجموعتين جميعهم). فحصت العينات ذاتها بطريقة PCR لغرض المقارنة, وأوضحت نتائج الفحص بهذه الطريقة أن سبعة أفراد من أصل الثمانية (والذين سبق وان كانت نتائج فحصهم بطريقة الفحص المجهري سالبة) كانوا مصابين بالجيارديا وكان هناك عينة واحدة سالبة سجلت بطريقة PCR. جدول (10) الشكل (4-1).

جدول (10): مقارنة الفحص المجهري بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR .

طريقة الفحص	عدد غير المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %	عدد المصابين *Giardia lamblia*	النسبة المئوية %
الفحص المجهري	8	% 42.11	11	% 57.894
الفحص بطريقة PCR	1	% 5.263	18	% 94.736

4.4 : فحص الحساسية لطرائق الاختبار المتبعة :

تم إجراء قياس حساسية الفحص المجهري حسب المعادلة الآتية واعتمادا على الزيادي (2004) :

$$\text{Sensitivity of the test (حساسية الاختبار)} = \frac{\text{العينات الموجبة بطريقة الفحص المجهري}}{\text{مجموع إفراد العينة}} \times 100$$

$$= \frac{11}{19} \times 100 = 57.894$$

تم إجراء قياس حساسية الفحص بطريقة PCR حسب المعادلة الآتـية :

$$\text{Specificity of the test (حساسية الاختبار)} = \frac{\text{العينات الموجبة بطريقة PCR}}{\text{مجموع إفراد العينة}} \times 100$$

$$= \frac{18}{19} \times 100 = 94.736$$

5.4 : فحوصات الدم والفحوصات الكيموحيوية :

1.4.4 : فحوصات الدم :

تمت المقارنة بين قيم خلايا الدم الحمر والبيض, وأنواع خلايا الدم البيض بين المصابين وغير المصابين بطفيلي الجيارديا فضلاً عن قياس قيمة هيموكلوبين الدم Hb عند الأشخاص
المفحوصين وتبين من الجدول (11) إن قيمة Hb عند الأشخاص المصابين انخفض وبصورة معنوية مقارنة بالأشخاص غير المصابين (11.496 غرام/ديسي لتر و13.251غرام/ديسي لتر على التوالي). كما تبين من الجدول نفسه إن معدل خلايا الدم الحمر عند الأشخاص المصابين وغير المصابين كانت متقاربة مع انخفاض بسيط عند الأشخاص المصابين حيث كان معدل عدد خلايا الدم الحمر عند المصابين ($4.323\ 10^9/mm^3$) وعند غير المصابين ($4.740\ 10^9/mm^3$). وفيما يخص معدل خلايا الدم البيض لوحظ وجود ارتفاع طفيف عند الأشخاص المصابين بطفيلي الجيارديا حيث كان معدل عدد خلايا الدم البيض عند المصابين ($7.698\ 10^3/mm^3$) وعند غير المصابين($7.278\ 10^3/mm^3$) كما لوحظ ارتفاع قيمة كل من خلايا الدم البيض اللمفاوية Lymphocytes وخلايا الدم البيض الحمضة Eosinophils عند الأشخاص المصابين بالجيارديا (47.876 % و 7.412% على التوالي) مقارنة بغير المصابين (32.868% , 3.230 %, على التوالي) مع وجود فروق معنوية عند إجراء الاختبار الإحصائي .

أما بالنسبة إلى قيمة خلايا الدم البيض العدلة Neutrophils فقد لوحظ أن معدل عدد تلك الخلايا في الأشخاص المصابين كان أوطأ منه عند الأشخاص غير المصابين (45.641% و56.451% على التوالي). ولم يلاحظ وجود اختلافات معنوية عند إجراء الاختبار الإحصائي في قيم خلايا الدم البيض الوحيدة Monocytes و خلايا الدم البيض القعدة Basophils فقد كانت (7.114% و 0.718 % على التوالي) عند المصابين فيما كانت عند غير المصابين (7.038 % و 0.753 %على التوالي) وكما موضح في الجدول (11) .

جدول (11) : معدلات أعداد خلايا الدم الحمر وخلايا الدم البيض وقيمة Hb عند الأشخاص المصابين وغير المصابين .

أعداد خلايا الدم	النوع	المتوسط	الانحراف المعياري	T	P-Value
هيموكلوبين الدم Hb	مصاب	11.496	0.829	8.91	0.000
	غير مصاب	13.251	1.026		
خلايا الدم الحمر RBC	مصاب	4.323	0.529	3.87	0.000
	غير مصاب	4.740	0.446		
خلايا الدم البيضWBC	مصاب	7.698	2.395	0.90	0.371
	غير مصاب	7.278	1.713		
الخلايا اللمفاوية Lymphocytes	مصاب	47.876	1.822	15.45	0.000
	غير مصاب	32.868	6.855		
الخلايا الحمضة Eosinophils	مصاب	7.412	1.783	10.172	0.000
	غير مصاب	3.230	2.074		
الخلايا العدلة Neutrophils	مصاب	45.641	11.069	4.91	0.000
	غير مصاب	56.451	8.595		
الخلايا الوحيدة Monocytes	مصاب	7.114	2.308	0.161	0.873
	غير مصاب	7.038	1.993		
الخلايا القعدة Basophils	مصاب	0.718	0.180	0.873	0.385
	غير مصاب	0.753	0.195		

2.4.4 : الفحوصات الكيموحيوية :

تمت المقارنة بين قيم البليروبين الكلي, الكالسيوم, حامض اليوريك, الألبومين والحديد بين الأشخاص المصابين وغير المصابين بطفيلي الجيارديا وتبين من الجدول (12) إن معدل قيم البليروبين الكلي عند الأشخاص المصابين وغير المصابين كانت متقاربة جداً مع ارتفاع بسيط عند الأشخاص غير المصابين حيث كان معدل البليروبين الكلي Total bilirubin عند المصابين

0.7127 مول/لتر وعند غير المصابين 0.7600 مول/لتر. وفيما يخص معدل الكالسيوم Calcium فقد لوحظ وجود انخفاض عند الأشخاص المصابين بطفيلي الجيارديا والذي سجل 1.383ملي مول/لترمقارنة بالأشخاص غير المصابين والذي كان 2.357 ملي مول/لتر, فيما لوحظ ارتفاع قيمة حامض اليوريك Uric acid عند الأشخاص المصابين بطفيلي الجيارديا 268.07 مول/ لتر مقارنة بغير المصابين 253.2 مول /لتر أما بالنسبة لقيم الألبومين Albumin والحديد Iron فقد لوحظ انخفاضهما وبصورة معنوية في حالة الأشخاص المصابين بالجيارديا إذ كانت قيمة الألبومين عند الأشخاص المصابين 32.156 غرام/لتر مقارنة بالأشخاص غير المصابين 40.971 غرام/لتر فيما كانت قيمة الحديد 11.678 مول/لترعند الأشخاص المصابين مقارنة بالأشخاص غير المصابين 14.908مول/ لتر.

جدول (12) : معدلات قيم الاختبارات الكيموحيوية عند الأشخاص المصابين وغير المصابين .

مصل الدم	النوع	المتوسط	الانحراف المعياري	T	P-Value
البليروبين الكلي Totalbilirubin	مصاب	0.7127	0.374	0.583	0.552
	غير مصاب	0.7600	0.375		
الكالسيوم calcium	مصاب	1.383	0.545	10.195	0.000
	غير مصاب	2.357	0.180		
حامض اليوريك uric acid	مصاب	268.07	79.509	0.852	0.391
	غير مصاب	253.2	80.301		
الألبومين albumin	مصاب	32.156	2.650	11.231	0.000
	غير مصاب	40.971	4.790		
الحديد Iron	مصاب	11.678	0.933	8.367	0.000
	غير مصاب	14.908	2.620		

5. المناقشة Discussion

1.5: الإصابات المشخصة في الدراسة الحالية :

تعد الإصابة بالطفيليات المعوية والسيطرة عليها من اكبر المشاكل الصحية التي تواجه المتخصصين في مجال الطفيليات والصحة العامة وهي واحدة من اكبر مشاكل العصر لما تسببه من أمراض ومخاطر متعددة (Schmidt and Roberts, 1989). فهناك حوالي اكثر من 150 نوعاً من الطفيليات يصيب الإنسان ويسبب أمراض عديدة للأطفال والبالغين على حد سواء وينتج عنها مخاطر اجتماعية واقتصادية في العديد من دول العالم حتى المتطورة منها (Markell *et al.*, 1999). وتنتشر الطفيليات بين مختلف الأعمار وفي البيئتين الريفية والحضرية وتصيب أفرادا من مستويات اقتصادية - اجتماعية مختلفة (Chin, 2000) .

إن الطفيليات المعوية (حيوانات ابتدائية وديدان) كانت وما تزال تتمتع بانتشار عالمي وجغرافي واسعين (Schmidt and Roberts,1989) وتعزى الإصابات العالية بالطفيليات إلى سهولة انتقال هذه الطفيليات أو أطوارها المعدية من شخص لآخر عن طريق المياه أو الأطعمة الملوثة أو عن طريق التماس المباشر معها تحت الظروف الملائمة . كما تختلف مصادر التعرض للإصابة بهذه الطفيليات اعتماداً على الثقافة, والوعي الصحي, والمستوى المعاشي والعادات الاجتماعية (Chin, 2000 ; Sun, 1982) ولازالت الإصابات الطفيلية المعوية تعد من أكثر العوامل مساهمة في كل من نقص التغذية Under nutrition إثناء مرحلة الطفولة وما ينجم عن ذلك من تباطؤ النمو الجسدي والعقلي الذي يبتلى به الأطفال (Shurie and Srivatsan, 1996). ويعد طفيلي الجيارديا واحداً من الطفيليات التي حظيت بعناية كبيرة من قبل الباحثين نظراً لما يسببه هذا الطفيلي من حالات الإسهال وسوء الامتصاص التي قد تؤدي إلى حدوث نقص في بعض المغذيات الأساسية للإنسان كالحديد , والبروتينات , والكربوهيدرات , والدهون , والفيتامينات El-Sayad *et al.* 2011), كما أن الإسهال بحد ذاته يؤدي إلى فقدان هذه المواد فضلا عن فقدان السوائل والايونات متسببا في حالة الجفاف ولزوجة الدم (Ichhpujani and Bhatia, 1994).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة الإصابة الكلية بأنواع الإصابات المشخصة في مدينة بعقوبة في محافظة ديالى كانت 67.7 % (جدول-1), وشملت توافر خمسة أنواع من الإصابات المشخصة في العينات التي تم فحصها (جدول - 2). وكانت الإصابة بالحيوانات الابتدائية هي الأكثر شيوعاً مقارنة مع الإصابة بالديدان. ومن الطفيليات المسجلة بالدراسة الحالية ثلاثة أنواع منها تعود للحيوانات الابتدائية وبنسب مئوية كالآتي : 26.94% لاميبا الزحار, 8.371 % للجيارديا اللامبلية, 1.978% لاميبا القولون, 1.522% لدودة الاسكارس, 5.022% للدودة الدبوسية. أن حدوث الإصابة بهذه الأنــواع يعكس ضعف المستوى الصحي والمناعي للأشخاص والذي يرتبط بدوره ارتباطاً وثيقاً بمستوى الصحة العامة والحالة التغذوية (Ichhpujani and Bhatia, 1994). خصوصا وان *Entamoeba coli* تعد من العوامل المؤشرة لحصول ضعف في دفاعات المضيف الموضعية أو الجهازية (النحاس, 2008). أن الطفيليات المسجلة تعد من الطفيليات ذات الانتشار العالمي حيث تشير تقديرات منظمة الصحة العالمية إلى أن 500 مليون شخص في العالم يعانون من الإصابات الأميبية, وحوالي 200 مليون شخص يعانون من الإصابة بالسوطي *Giardia lamblia* و1400مليون شخص مصابين بالصفر الخراطيني (Markell *et al*., 1999). كما سجلت بعض الدراسات العراقية نسبة انتشار بهذه الطفيليات المعوية ومنها دراسة (البياتي, 2000; Al-Saeed and Issa, 2006 ; صلبي ورشيد , 2010) والتي أشارت إلى توافر هذه الطفيليات وبنسب مختلفة .

لقد تركزت الدراسة الحالية على طفيلي *Giardia lamblia* حيث كانت نسبة الإصابة بهذا الطفيلي في الدراسة الحالية 8.371 % وهي مقاربة لما سجله كل من Legesse and Erko (2004), في اثيوبيا 6.2 %, و Garg وجماعته (2005) في جنوب اسيا و افريقيا 6 %, و Kassem وجماعته (2007) في ليبيا والذي سجل نسبة إصابة بلغت 10.29% , كما سجل Wani وجماعته (2007) في الهند نسبة إصابة بلغت 7.2%, كما وتقارب نسبة الإصابة المسجلة في هذه الدراسة نسبة الإصابة التي سجلها Al-Megrin (2010) و Almeida وجماعته (2010b) في المملكة العربية السعودية وشمال البرتغال (6.6 % , 8.4 % على التوالي). يعود هذا التقارب إلى أن العادات غير الصحية كاللعب بالأتربة بالنسبة للصغار أو عدم غسل الأيدي وتناول الأغذية الملوثة قد يكون لها دوراً في انتشار هذا الطفيلي

(Amaral *et al.*, 2006). ومن جانب آخر فالنسبة المسجلة في الدراسة الحالية أوطأ مما سجله Sharif (2002) وقد بلغت 22.84 % في محافظة خان يونس في فلسطين, وأوطأ مما سجله Al-Saeed and Issa (2006) في مدينة دهوك والتي بلغت 38.5%, وأوطأ مما سجل في Sierraleone والتي بلغت 29% (Gbakima *et al.*, 2007), وأوطأ مما سجل في محافظة نينوى, وفي الأمازون البرازيلي وبنسب 20.4 % و 12.5%, على التوالي (الكلاك و النعيمي , 2007 ; Valverde *et al.*, 2011). في حين أن نسبة الإصابة المسجلة في الدراسة الحالية هي أعلى من نسبة الإصابة المسجلة في تايلند والتي بلغت 1.25% والمسجلة من قبل Saksirisampant (2006) وهي أعلى مما سجله Wakid وجماعته (2009) في مدينة مكة المكرمة في المملكة العربية السعودية والتي بلغت 1.98% و Akhlaghi وجماعته (2009) في طهران والتي بلغت 2.5 % . وقد يعود الاختلاف من حيث الارتفاع والانخفاض عن النسبة المسجلة في الدراسة الحالية إلى اختلاف الظروف البيئية والاجتماعية للمناطق في تلك الدراسات .

2.5: بعض الجوانب الوبائية المؤثرة في نسب الإصابة بالجيارديا :

أظهرت نتائج الدراسة الحالية تقارب نسبة الإصابة بين الذكور والإناث (8.356% و 8.389% على التوالي) وكما مبين في جدول (3) إذ لم يسجل وجود فرق معنوي بين نسبة الإصابة في الذكور والإناث. وقد اتفقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه كل من Botero-Garcés وجماعته (2009) إذ سجل نسبة إصابة 27.6 % في الذكور و27.6 % في الإناث , و Akhlaghi وجماعته (2009) إذ سجل نسبة إصابة بلغت 2.3% في الذكور و2.8% في الإناث, كما سجلت الدراسة التي قام بها Júlio وجماعته (2012) نسبة 6.9 % في الذكور و6.5 % في الإناث مع عدم توافر فروقات معنوية في نسب الإصابة بين الذكور والإناث في تلك الدراسات . وقد يعزى تقارب نسب الإصابة في الذكور والإناث إلى تعرض كلا الجنسين إلى الظروف الصحية والاجتماعية نفسها وخصوصا إن الذكور والإناث في منطقة الدراسة (مدينة بعقوبة وبعض المناطق الريفية المحيطة بها) لهم نفس الفرص في العمل والتعلم .

فيما سجلت دراسات أخرى توافر علاقة بين نسبة الإصابة والجنس حيث سجل كل من صلبي ورشيد (2010) و Ejiofor وجماعته (2011) نسبة إصابة في الذكور أعلى مما سجلوه لدى الإناث, وقد يعود ذلك إلى تعدد نشاط والفعاليات التي يقوم بها الذكور مقارنة بالإناث, في حين وجد في

دراسات أخرى أن الإناث كانت أكثر عرضة للإصابة بالجيارديا من الذكور نتيجة بعض الفعاليات التي يقمن بها كتحضير الطعام والتنظيف والعناية بالأطفال مما يجعلهن أكثر عرضة للإصابة (Tigabu *et al.*, 2010 ; Raza and Sami, 2009), إن للنشاطات والفعاليات التي يقوم بها الفرد الأثر الكبير في حصول الإصابة .

وقد بينت الدراسة توافر علاقة بين عمر المصاب ونسبة الإصابة بالجيارديا حيث سجلت أعلى نسبة إصابة في الفئة العمرية 18 ≤ 5 ≥ فيما كانت أوطأ نسبة إصابة في الفئة العمرية 5 ≤ وهذا يتفق مع كل من Al-Saeed and Issa (2006) وملاح (2007) وArani وجماعته (2008) و Nkrumah and Nguah (2011) الذين أوضحوا في دراساتهم أن نسبة الإصابة بالجيارديا كانت أعلى في الفئة العمرية الأقل من 18 سنة. أن نسبة الإصابة المرتفعة في الأطفال والمراهقين قد تعزى إلى طبيعة فعالياتهم ونشاطاتهم فضلا عن قلة العناية بالنظافة الشخصية في اغلب أفراد هذه الفئة العمرية. كما أن تناول الأطعمة المكشوفة والملوثة بأكياس الطفيلي وشراؤها من البائعة المتجولين القريبين من المدارس تمثل وسيلة لانتقال العدوى لهذه الفئة العمرية (Al-Hamdani, 1993) .

أما علاقة الإصابة بعدد أفراد الأسرة حسب جدول (5) فقد بلغت أعلى نسبة للإصابة في الأشخاص الذين ينتمون إلى اسر بلغ عدد أفرادها 14 فرد فأكثر 12.435% واقل نسبة كانت في الأفراد الذين ينتمون إلى اسر بلغ عدد أفرادها (4-5) فرد 1.923% , وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه Pereira وجماعته (2007) و Júlio وجماعته (2012) وأشاروا إلى أن نسبة الإصابة بالطفيلي كانت تزداد بزيادة عدد إفراد الأسرة . ويمكن تفسير ذلك على أساس انتقال العدوى بين الأفراد نتيجة لتوافرهم بأعداد كبيرة في المكان نفسه حيث يوفر الازدحام فرصة اكبر لانتقال العدوى من شخص لآخر عن طريق التماس أو استخدام الأدوات نفسها أو الملابس (Pereira *et al.*, 2007 ; Keystone *et al.*, 1978) .

وقد لوحظ من خلال نتائج الدراسة أن هناك علاقة وثيقة بين الإصابة بالطفيلي ومصدر مياه الشرب المستخدمة جدول (6) فقد ظهر أن اغلب الإصابات كانت لدى الأفراد الذين يستخدمون ماء النهر للشرب 17.647% وأوطأ نسبة إصابة كانت ضمن فئة الأفراد الذين يشربون ماء الإسالة 4.0%. وهذه النتيجة متوقعة إذ أن الماء يعد مصدراً رئيساً من مصادر العدوى . إن الماء الصالح للشرب (الماء المعالج بالكلور) من الوسائل المهمة للسيطرة على العديد من الأمراض مثل الإسهال ,

والكوليرا, والحمى التيفوئيدية , والإصابات الكبدية , والزحار البكتيري والأميبي (, WHO 1993), وقد قدرت منظمة الصحة العالمية أن حوالي 80% من الأمراض في العالم مرتبطة ارتباطاً وثيقاً مع الماء غير المعقم (WHO, 1993). إن مياه النهر قد تتلوث نتيجة استخدام الأسمدة الحيوانية والبشرية فضلا عن تلوثها بالمخلفات الناتجة من المستشفيات والصرف الصحي وغيرها من مصادر تلوث المياه (Ouattara *et al.*, ; Almeida *et al.*, 2010b ; Ayalew, 2006 2010). أما نسبة الإصابة لدى الأفراد الذين يستخدمون ماء الإسالة بوصفه مصدراً للشرب فقد يعود سببها إلى تعدد مصادر تلوث مياه الشرب وذلك بتسرب مياه المجاري والمستنقعات إلى شبكة مياه الشرب نتيجة لوجود تكسرات كثيرة في هذه الشبكة فضلاً عن قلة المعقمات والمطهرات التي تضاف إلى المياه فضلا عن أمكانية وجود مصادر أخرى لحدوث الإصابة كالطعام الملوث والتماس مع المصابين (Tigabu *et al.*, 2010 ; Almeida *et al.*, 2010b).

ومن نتائج الدراسة الحالية تبين أن نسبة الإصابة كانت متقاربة بين الريف والمدينة (8.4% , 8.280%, على التوالي) ومن الاختبارات الإحصائية تبين عدم وجود فرق معنوي بين الإصابة بالطفيلي وموقع السكن جدول (7). وهذه الدراسة تتفق مع ما توصل إليه Júli وجماعته (2012) إذ سجل نسبة إصابة 5.3 % في الريف و نسبة 7.4 % في المدينة. إلا أن الدراسة الحالية لم تتفق مع ما توصل إليه Rayan وجماعته (2010) إذ سجلوا نسبة إصابة 17.9% في الريف وهي أعلى من نسبة الإصابة 14% في المدينة. يعد التطور في المستوى الثقافي والاقتصادي لبعض المناطق الريفية عاملاً مهماً في تقليل نسب الإصابة بالطفيليات المعوية .

واظهر التحصيل الدراسي للأب ارتباطاً وثيقاً بالإصابة جدول (8) فقد سجلت أعلى نسبة للإصابة لدى الأشخاص الذين كانوا (أو كان والدهم) غير متعلم 12.565 % أما اوطا نسبة للإصابة كانت لدى الأشخاص الذين كانوا (أو كان والدهم) حاصلاً على الشهادة الجامعية 3.947 % . وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه البياتي (2000) و Mumtaz وجماعته (2009) وBotero-Garcés وجماعته (2009). أما فيما يتعلق بمستوى التحصيل الدراسي للأم فقد أظهر الجدول (9) أن أعلى نسبة إصابة كانت عند الأشخاص الذين كانت أمهاتهم غير متعلمات بنسبة 11.764% أما أوطأ نسبة إصابة فعند الأشخاص الذين تكون أمهاتهم حاصلات على شهادة الجامعية وبنسبة 6.043 %. وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه البياتي (2000) و Mumtaz وجماعته

(2009) و Júli وجماعته (2012) و Botero-Garcés وجماعته (2009) إذ كانت نسب الإصابة عند الأمهات ذوات المستوى التعليمي العالي اقل مما سجل عند الأمهات الأميات في هذه الدراسات, ويعود ذلك إلى المستوى الثقافي للوالدين والذي يلعب دوراً مهماً في تعليم الأطفال القواعد الصحية الصحيحة.

3.5: مقارنة الفحص المجهري بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR :

في الدراسة الحالية تم استخدام طريقتين في التشخيص هما طريقة الفحص المجهري, وطريقة الفحص بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) , وقد تمت مقارنة نتائج هذه التقنية بالنتائج المتحصل عليها بطريقة الفحص المجهري وقد أظهرت المقارنة كفاءة طريقة تقنية PCR حيث سجل الفحص حساسية 94.736% مقارنة بالفحص المجهري الذي سجل حساسية بلغت 57.894%, فقد أشار Nikaeen وجماعته (2003) إلى حساسية وكفاءة الفحص بطريقة PCR مقارنة بطريقة الفحص المجهري, وبين McGlade وجماعته (2003) كفاءة طريقة PCR من خلال مقارنة أجراها بين ثلاث طرق لتشخيص الجيارديا والتي شملت طريقة الفحص المجهري وطريقة الاليزا وطريقة PCR لعينات مأخوذة من قطط مصابة بالطفيلي. كما أشار Marangi وجماعته (2010) في دراسة أجراها على عينات مأخوذة من براز الكلاب إن طريقة الفحص بطريقة PCR كانت أكثر كفاءة من طريقة الفحص المجهري. وأكدت El-Badry وجماعتها (2010) ما توصل إليه الباحثين من كفاءة طريقة الفحص بطريقة PCR مقارنة بالطرق الأخرى وذلك في دراسة أجرتها على عينات مأخوذة من الأمعاء بعملية الشفط . وقد أشارت هذه الدراسات إلى إمكانية استخدام طريقة PCR نظراً لكفاءتها وقدرتها على تشخيص الطفيلي وان كان بإعداد قليلة وهذا ما يساعد في الدراسات الوبائية لتحديد الأشخاص المصابين والذين لا يظهرون إي إعراض مرضية. إن تقنية PCR حلت محل تقنيات كثيرة أخرى, لأنها أثبتت فعالية كبيرة ودقة ممتازة كما أنها تعد من الطرائق ذات الحساسية العالية نظراً لقدرتها على تشخيص الإصابة حتى في حالة وجود طفيلي واحد في نموذج البراز المفحوص (David *et al.*, 2011).

أجريت التفاعلات التضاعفية لسلسلة الدنا (PCR) لجميع العينات المفحوصة البالغ عددها (19) عينة باستعمال بوادئ متخصصة تستهدف التسلسل النوعي لجين 171 لغرض تشخيص الطفيلي باعتماد برنامج التفاعل في الدراسة المذكورة, وبعد إجراء بعض التحويرات في الدراسة الحالية

المتضمن دورة واحدة لمدة (2) دقيقة بدرجة (94) مْ للمسخ الأولي لدنا القالب تليها (28) دورة تشمل ثلاث مراحل (الأولى والثانية والثالثة) مدتها (1) دقيقة بدرجات حرارة (94 ,60 ,72) مْ على التوالي للبادئ الخاص بالطفيلي, تبعتها دورة أخرى إضافية لمدة (5) دقائق بدرجة حرارة (72) مْ لعملية الاستطالة النهائية لشريط الدنا المتضاعف .

بعد ترحيل ناتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز (3%) لوحظ عند فحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية ظهور حزم في العينات التي أظهرت نتائج سلبية عند فحصها مجهرياً دلالة على وجود إصابة لم تشخص مجهرياً ومشخصة بطريقة PCR مع بقاء نتيجة بدون ظهور حزمة دلالة على عدم تشخيص الإصابة بهذه العينة مجهرياً فضلا عن طريقة PCR .

4.5: فحوصات الدم والفحوصات الكيموحيوية :

لقد سجل ارتفاعاً معنوياً في كل من قيم الخلايا اللمفاوية وخلايا الدم البيض نوع الحمضة ومعدلاتها في الدراسة الحالية جدول (11) وهذا يتفق مع كل من Dos Santos and Vituri (1996) و Sackey (2001) . إن الارتفاع المعنوي لهذه الخلايا قد يدل على حصول رد فعل مناعي خلوي ضد الطفيلي أدى إلى ارتفاع أعداد الخلايا الدفاعية ومعدلاتها لدى الأشخاص المصابين, وقد أشارDos Santos and Vituri (1996) أن الطفيلي يعد من الطفيليات التي تؤدي إلى ظهور رد فعل تحسسي في جسم المصاب والذي قد يؤدي إلى زيادة في أعداد الخلايا الحمضة واللمفاوية .

ولوحظ في الدراسة الحالية حدوث انخفاض في نسبة الهيموكلوبين وخلايا الدم البيض العدلة في المصابين مقارنة مع غير المصابين, وهذا يتفق مع دراسة Dos Santos and Vituri (1996) و Baghaei (2003) واللذين أشارا إلى حصول انخفاض في الهيموكلوبين والخلايا العدلة عند المصابين بالجيارديا . فيما لم يلاحظ حدوث تغير في إعداد خلايا الدم الحمر والخلايا البيض أحادية النواة والخلايا البيض القعدة .

ويشير جدول (12) إلى حدوث زيادة في قيمة حامض اليوريك عند الأشخاص المصابين مقارنة بغير المصابين وهذا يتفق مع El-Sayad وجماعته (2011) والذي أشار إلى حصول ارتفاع في قيمة حامض اليوريك عند المصابين بالجيارديا. إن سبب الزيادة قد يعود إلى زيادة تغير مادة Xanthine / hypoxanthine إلى حامض اليوريك من خلال زيادة أكسدة مادة الزانثين بفعل إنزيم

Xanthine oxidase والذي يرتبط بزيادة تفاعلات الأكسدة. إن حامض اليوريك يزود الجسم بالية دفاعية ضد الطفيلي من خلال زيادة الجذور الحرة (El-Sayad *et al.*, 2011) .

أما بالنسبة للألبومين فقد سجلت الدراسة الحالية حصول انخفاض في نسبة الألبومين, وهذا يتفق مع رحيمو والنعيمي (2007). إن انخفاض مستوى الألبومين في مصل الأشخاص المصابين بالجيارديا قد يعود إلى نقص المغذيات الأساسية لتخليق البروتين وان هذا قد يقود إلى أعراض ضعف الامتصاص وكذلك إلى حالات طرح البروتين حيث يزداد فقدان البروتين عند الإصابة بداء الجيارديا بمقدار10-20 مرة عن الحالة الطبيعية, وهذا يؤدي إلى انخفاض الألبومين في الدم رحيمو والنعيمي (2007) .

وقد سجلت الدراسة الحالية انخفاض قيمة الحديد في مصل الأشخاص المصابين مقابل قيمته عند الأشخاص غير المصابين وهذا يتفق مع Demirci وجماعته (2003), و الزرفي (2005) و El-Sayad وجماعته (2011). والذين سجلوا انخفاض مستوى الحديد في مصول الأشخاص المصابين بالجيارديا مقارنة مع غير المصابين, وقد يعزى انخفاض مستوى الحديد إلى ضعف الامتصاص عند الأشخاص المصابين. إن الانخفاض في مستوى الحديد في الدراسة الحالية يرتبط بانخفاض الهيموكلوبين.

وأشارت الدراسة الحالية إلى انخفاض مستوى الكالسيوم في مصل الأشخاص المصابين بالجيارديا مقابل الأشخاص غير المصابين وهذا يتفق مع El-Sayad وجماعته (2011), والذي أشار إلى حدوث انخفاض في قيمة الكالسيوم عند الأشخاص المصابين بالجيارديا وقد يعود السبب في انخفاض الكالسيوم إلى ضعف الامتصاص للمغذيات الأساسية من قبل الأشخاص المصابين. أما قيمة البليروبين فلم تسجل الدراسة الحالية تغيراً فيها .

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات Conclusions :

تم من خلال الدراسة الحالية استنتاج ما يلي :

1. أظهرت الدراسة أن 43.8 % من المرضى المصابين بالإسهال والمراجعين لبعض المستشفيات والمراكز الصحية في مدينة بعقوبة/محافظة ديالى كانوا مصابين بأنواع مختلفة من الطفيليات ثلاث منها تعود للحيوانات الابتدائية واثنين تعود للديدان, وقد كانت هناك فروقات معنوية في نسب الإصابات المختلفة المشخصة لدى المصابين حيث كانت أعلى نسبة مسجلة للحيوانات الابتدائية و اوطا نسبة للديدان .
2. سجلت نسبة إصابة بطفيلي الجيارديا بلغت 8.371% وقد لوحظ عدم توافر علاقة بين الإصابة وجنس المصاب, فيما تبين أن هناك علاقة بين الإصابة وعمر المريض حيث شهدت نسبة الإصابة بالطفيلي حدوث زيادة كلما تقدم عمر المريض .
3. ازدياد نسبة الإصابة بطفيلي الجيارديا لدى الإفراد الذين يعتمدون مياه الأنهار والآبار بوصفها مصادر للشرب مقارنة بأولئك الذين يعتمدون على ماء الإسالة, فيما لم يلاحظ توافر فروقات معنوية بين نسبة الإصابة وبين منطقة السكن في الريف والمدينة .
4. هناك علاقة وثيقة بين حدوث الإصابة وكل من عدد أفراد الأسرة والتحصيل الدراسي للأبوين فكلما كان المستوى التعليمي للأبوين منخفضاً زادت احتمالية حدوث الإصابة.
5. أن تقنية PCR أكثر كفاءة في تشخيص الإصابة من الفحص المجهري نظراً لحساسيتها العالية في تشخيص الإصابة .
6. بينت الدراسة توافر علاقة بين الإصابة وقيم بعض اختبارات الدم حيث ظهر ارتفاع معنوي في قيم كل من خلايا الدم البيض اللمفاوية والحمضة , بينما ظهر انخفاض معنوي في قيم كل من هيموكلوبين الدم وخلايا الدم البيض العدلة, و لم يلاحظ وجود فرق معنوي بين كل من خلايا الدم الحمر وخلايا الدم البيض والخلايا الوحيدة و القعدة عند المصابين بطفيلي الجيارديا .
7. بينت الدراسة أيضا وجود علاقة بين الإصابة وبعض الاختبارات الكيموحيوية حيث ظهر في المرضى المصابين بالجيارديا انخفاضاً ذو دلالة إحصائية في مستويات كل من الكالسيوم والألبومين والحديد.

التوصيات Recommendations :

وفي ضوء نتائج الدراسة الحالية وبغية النهوض بالواقع الصحي يمكن اقتراح الآتي :

1. التحري عن مسببات الاسهال بصورة عامة وعن طفيلي الجيارديا بصورة خاصة وإجراء الفحوصات الروتينية للأشخاص المصابين وغير المصابين مع التأكيد على تكرار الفحص لأكثر من مرة للتأكد من حصول الإصابة بصورة قاطعة لإعطاء العلاج اللازم ومحاولة التخلص من هذه الإصابة من المصابين .
2. إجراء فحص دوري للعاملين في المطاعم , وأماكن صنع الأغذية والمرطبات , ودور الحضانة ورياض الأطفال . ومحاولة توفير المياه الصحية الصالحة للشرب إلى ابعد منطقة في المحافظة نظراً لعلاقة الماء بإمراض عديدة .
3. توفير جهاز PCR في المستشفيات وذلك لغرض الإفادة منه في إجراء الفحوصات الدقيقة لبعض الإمراض ومنها الطفيلية وذلك لكفاءة هذا الجهاز في تحديد الإصابة الخفيفة (حيث إن التقنية تشخص العامل المرضي وان كانت شدة نسبة الإصابة طفيفة جداً) وكذلك لمساعدة الباحثين لاتمام بحوثهم .
4. التعاون مع دائرة صحة ديالى والمنظمات المدنية لإقامة الندوات والحلقات النقاشية لشرح كيفية حدوث الإصابة للمواطنين والبحث في سبل استئصال هذه الإمراض من المجتمع .
5. أجراء دراسات مستقبلية للمقارنة بين الطرائق المختلفة لتشخيص الطفيلي كالطرق المناعية واستزراع الطفيلي .
6. أجراء المزيد من الدراسات المستقبلية عن الجوانب الجزيئية والمتعلقة بالسلالات المختلفة للطفيلي .

المصادر العربية Arabic References

إسماعيل, محمد طاهر (2009). أنواع الطفيليات المعوية وانتشارها بين أطفال مرحلة التعليم الأساسي في مدينة حماه – سورية . مجلة التشخيص المخبري, 5 (10) : 4 - 12 .

البياتي , نغم ياسين (2000) . الإصابات بالطفيليات المعوية وبقمل الرأس لدى تلامذة بعض المدارس الابتدائية في مركز قضاء الخالص , محافظة ديالى . رسالة ماجستير, كلية التربية (ابن الهيثم) , جامعة بغداد : 81صفحة .

الحديثي , إسماعيل عبد الوهاب وعواد , عبد الحسين حبش (2000) . علم الطفيليات , دار الكتب للطباعة والنشر , جامعة الموصل : 487 صفحة .

الزرفي , خوله عبدا لله سلمان عبد الله (2005) . دراسة وبائية لبعض الجوانب المرضية للطفيليات المعوية المشخصة بين المرضى الوافدين والراقدين في مستشفيات محافظة النجف . رسالة ماجستير, كلية التربية للبنات , جامعة الكوفة : 77 صفحة .

الزيادي , سندس وفي غني هنين (2004) . عزل وتشخيص الطفيلي *Trichomonas vaginalis* عن مرضى المشعرات المهبلية في مدينة النجف . رسالة ماجستير, كلية التربية, جامعة الكوفة : 66 صفحة .

العنبكي , قدس علي احمد (2002) . دراسة بعض الجوانب المناعية والمرضية للإصابة بطفيلي *Giardia lamblia* . رسالة ماجستير, كلية العلوم, الجامعة المستنصرية : 86 صفحة .

الكبيسي, علي حسين مكي (2000) . دراسة بعض الجوانب الوبائية للطفيليات المعوية في محافظة بابل / العراق . رسالة ماجستير , كلية العلوم , جامعة بابل : 48 صفحة .

الكبيسي, علي حسين مكي (2007) . تأثير المستخلصات المائية لبعض النباتات في تثبيط المسببات البكتيرية والطفيلية للإسهال في محافظة كربلاء, أطروحة دكتوراه, كلية التربية ابن الهيثم : 152 صفحة.

الكفري, عبير و حربا , عبد القادر(2009) . الطفيليات المعوية عند تلاميذ التعليم الأساسي في مدينة ادلب وريفها . مجلة التشخيص المختبري, 5 (2) : 1 - 6 .

الكلاك, سندس نذير و النعيمي , بشرى حسن سعيد (2007) . دراسة وبائية لبعض الطفيليات المسببة لإسهال الاطفال في ناحيتي برطلة ووانة في محافظة نينوى شمال العراق . مجلة الكوفة , 8 (4) : 59 – 69 .

الكواز, الهام عبد الواحد مجيد (1992) . علم الطفيليات النظري , دار الكتب للطباعة والنشر, جامعة الموصل : 288 صفحة .

النحاس, سمر (2008). علم التطفل والطفيليات . منشورات جامعة دمشق, كلية العلوم : 512 صفحة .

ببك , ج . و. وديفيز, ج . إ . (1985) . علم الطفيليات الطبية . ترجمة علي محمد سليط ونبيل عناد صالح . مطبعة جامعة الموصل : 516 صفحة .

جاسم , برهان عبد اللطيف ؛ مولود , نبيل عبد القادر ونصر الله , بشير عبد الله (1997) . دراسة مسببات الإسهال والعوامل المؤثرة عليه لدى الأطفال دون سن الخامسة من العمر لبعض مناطق محافظة ديالى/العراق . مجلة علوم المستنصرية , 8 (3): 18-24.

رحيمو, زهير إبراهيم فتوحي والنعيمي , سماهر حازم (2007). تقدير الكلوبيولينات المناعية والألبومين في مصل المرضى المصابين بثلاثة أنواع من الابتدائيات المسببة للإسهال في محافظة نينوى. مجلة أبحاث كلية التربية الأساسية , 5(3): 155-161 .

سعيد , بشرى حسن و حميد , سندس نذير(2010). دور أظافر الأيدي والإقدام في مدى الانتشار والتلوث بالطفيليات المعوية وأطوارها بين تلاميذ محافظة دهوك - شمال العراق. مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة , 4 (2) : 25-32 .

شحادة , صلاح الدين والدبش , محمد خليل (2007) . انتشار الطفيليات المعوية عند أطفال المدارس في محافظة ريف دمشق والعوامل المؤثرة فيه . مجلة التشخيص المخبري, 4 (7) : 20 – 9 .

صلبي, أحسان محمد ورشيد , إبراهيم فضل (2010) . دراسة في وبائية لمسببات الإسهال الطفيلية للإنسان في منطقة كربلاء . وقائع المؤتمر العلمي العاشر لكلية الطب البيطري : 265 - 271 .

غندور, تميم مصباح ؛ خوري, لينا وشاهين إميل (2008) . اضطراب البروتينات النوعية عند الإصابة بداء الجيارديات المعوي . مجلة التشخيص المخبري , 1 (5) : 18-25 .

ملاح , محمد عوده (2007) . دراسة انتشار داء الجيارديات في الإنسان في محافظة المثنى, مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري , 6 (1) : 59- 68 .

مولان, عبد اللطيف وميرو, وجدان محمد صالح (1990) . علم الطفيليات , الابتدائيات والديدان المسطحة الطفيلية , ج1 . مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر, الموصل : 367 صفحة .

مولود, نبيل عبد القادر؛ عبد الله , هلال مسعود وعامر, عبد الله يوسف (1998). مسح لطفيليات القناة الهضمية لسكان محافظة ديالى / العراق . مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية , 9 (2) : 1 – 18 .

Foreign References المصادر الأجنبية

Abdel-Hafez, S.K. and Abdel-Hafez, Y.M. (1984 . Human intestinal parasites in the Jordan Valley : A preliminary report. J. Biol. Sci. Res., 15 (1) : 43 - 53 .

Abu-Madi , M.A. ; Behnke, J.M. and Ismail, A. (2008) . Patterns of infection with intestinal parasites in Qatar among food handlers and housemaids from different geographical regions of origin.Acta .Trop., 106 (3) : 213 - 220.

Adam, R. D. (1991) . The biology of *Giardia spp*. Microbiol. Rev., 55 : 706 - 732.

Adam, R.D.(2000). The *Giardia lamblia* genome. Int. J. Parasitol., 30 : 475 - 484 .

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

Adam, R. D. ; Nigam, A. ; Seshadri, V. ; Martens, C.A.; Farneth, G.A. ; Morrison, H.G. ; Nash, T.E. ; Porcella, S. F. and Patel, R. (2010). The *Giardia lamblia vsp* gene repertoire: characteristics, genomic organization, and evolution . Bio. Med. Cent. Genomics , 11 : 424 - 437 .

Akay, H. ; Kustimur, S. and Beyazova, U. (2009) . Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by detection of specific antigen . Hasek. Tip. Bült., 47(1): 13 – 19 .

Akhlaghi, L. ; Shamseddin, J. ; Meamar, A.R. ; Razmjou, E. and Oormazdi,H. (2009). Frequency of intestinal parasites in Tehran . Iranian. J. Parasitol., 4 (2) : 44 - 47.

Al-Hamdani, F.G.N. (1993). Parasitic infections in rural areas around Baghdad city. M. Sc. Thesis, Coll. Sci. Univ. Baghdad: 72 pp.

Al-Izzi, N.S. (1998) . Prevalence of intestinal parasitic infection in preschool children in Mosul city. J. Fac. Med. Baghdad , 40(4) : 478 – 480 .

Al-Jebory, K.A.(2005).Effect of *Giardia* on some biochemical variables in human blood serum . Appl. J. P. Sci., 2 (1) : 29 - 35 .

Al-Khalife, I.S. (2006). Retrospective analysis of intestinal parasitic infections diagnosed at a University Hospital in central , Saudi Arabia . Saudi Med. J., 27 (11) : 1714- 1718.

Al-Megrin,W.A.(2010). Intestinal parasites infection among immunocompromised patients in Riyadh , Saudi Arabia . Pakist . J . Biol. Sci., 13(8) : 390 - 394 .

Al-Taie, L.H. and Ali, F. M. (2009).Epidemiology of giardiasis in Sulaimaniya and Cham chamal with its effect on some biochemical parameters and PCV. Qadisyah Med. J., 5(7) : 45- 53.

Al-Warid, H.S.J.(2012). Study of some epidemiological aspects of giardiasis in North of Baghdad. J. Baghdad Sci., 9(2): 251-258.

Alam, M. ; Ilias, M.;Siddique,A.;Kabir, M. ; Nazib, F. and Khan, G. M. (2011). Genotype -specific detection of *Giardia lamblia* in stool samples of diarrhoeal and non diarrhoeal patients in Dhaka , Bangladesh . Dhaka Univ.J. Biol . Sci., 20(2) : 183 - 189 .

Albonico, M. ; De Carneri, I. ; Di Matteo, L. ; Ghiglietti, R. ; Toscano, P. Uledi, M.K. and Savioli, L. (1993) . Intestinal parasitic infections of urban and rural children on pemba Island : Implications for control. Ann. Trop. Med. Parasitol., 87 (6) : 579 - 583 .

Al-Dujaili, A.A.I. (1993) . Prevalence of intestinal parasitic infection among primary school children in Kerbala . Dipl. Comm. Med. Thesis, Coll. Med., Univ. Al-Nahrain : 50 pp.

Al-khushali, M.N.(2012).Toxoplasmosis in Relation to *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. Diyala J. Med., 2(1): 37 pp.

Ali, S.A. and Hill, D.R. (2003) . *Giardia intestinalis* . Curr. Opin. Infect. Dis., 16 : 453 – 460 .

Almeida, A. ; Pozio, E. and Caccio, S.M.(2010a). Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new Real - Time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. Appl. Env. Microbiol.,76(6):1895 -1901.

Almeida, A. ; Moreira, M.J. ; Soares, S. ; Delgado, M.L. ; Figueiredo, J. ; Silva, E. ; Castro, A. and Cosa, J. M.C.(2010b). Presence of

Cryptosporidium spp. and *Giardia duodenalis* in drinking water samples in the north of Portugal. Korean J. Parasitol., 48(1): 165-170.

Al-Mekhlafi, M.S. ; Azlin, M. ; Nor Aini, U. ; Shaik, A. and Sa'iah, A. (2005). Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 99: 686–691.

Al-Saeed, A.T. and Issa, S. H. (2006). Frequency of *Giardia lamblia* among children in Dohuk, northern Iraq. East. Mediterran. Health J., 12 (5) : 555 - 561 .

Al-Saeed, A.T. and Issa, S.H. (2010). Detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens using enzyme linked immunosorbent assay. East. Mediterran. Health. J., 16(4): 362 - 364.

Al-Saadi, A.A. ; Hameed, M.K. and Zeki, Z. (1995) . Parasitic infection among primary school children in Tikrit city . Sci. J. Tikreet Univ., 1(1) : 71 - 74 .

Amaral, F.M.M. ; Ribeiro, M.N.S. ; Barbosa- Filho, J.M. ; Reis, A.S. ; Nascimento, F.R.F. and Macedo, R. O. (2006). Plants and chemical constituents with giardicidal activity. Rev. Bras. J. Farmacogn Braz. J. Pharmcogn., 16: 696 - 720 .

Ankarklev, J.(2012). Inter and Intra - assemblage characterizations of *Giardia intestinalis* : from clinic to genome. M.Sc. Thesis, Fac. Sci. Tech., Uppsala Uni. : 85 pp.

Ankarklev, J. ; Jerlstrom-Hultqvist, J. ; Ringqvist, E. ; Troell, K. and Svard, S.G. (2010). Behind the smile : cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nat. Rev. Microbiol., 8: 413- 422 .

Arani, A.S.; Alagheh bandan, R. ; Akhlaghi, L. ; Shahi, M. and Lari, A.R.(2008). Prevalence of intestinal parasites in apopulation in south of Tehran, Iran. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo , 50 (3) : 145 - 149 .

Artezer, M.A.(2009). A comparison of the SNAP *Giardia* fecal antigen test and the zinc sulfate double centrifugation fecal flotation procedure to diagnosis *Giardia intestinalis* infections in two populations of infected dogs. M. Sci. Thesis, Vet. Med. Coll., Kansas State Univ. : 54 pp .

Ayalew, D. (2006). Association of *Cryptosporidium parvum, Giardia lamblia and Entamoeba histolytica / dispar* infection with drinking water sources among children in Rural part of Dire – Dawa , Eastern Ethiopia . M . Sc.Thesis, Sch. Gradul. Stul., Addis Ababa Univ.:79 pp.

Baghaei, M. (2003) . Hypoproteinaemia and edema due to Giardiasis. Iran. J. Med. Sci., 28 (2) : 98 – 99 .

Ballweber, L.R.(2001).Veterinary parasitology . Butterworth – Heinemann, Publ. U.S.A. : 324 pp .

Baruch, A.C. ; Isaac-Renton, J. and Adam, R.D.(1996). The molecular epidemiology of *Giardia lamblia* : a sequence-based approach. J. Infect. Dis., 174(1) : 233-236 .

Behr,M.A. ; Kokoskin, E. ; Gyorkos, T.W. ; Cédilottle, L. ; Faubert, G.M. and Maclean, J.D. (1996). Laboratory diagnosis for *Giardia lamblia* infection : A comparison of Microscopy , coprodiagnosis and serology. Can. J. Infect. Dis., 8 (1) : 33 - 38 .

Bello, J.; Núñez, F.A.; Gonzàlez, O.M. ; Fernàndez, R. ; Almirall, P. and Escobedo, A.A. (2011). Risk factors for *Giardia* infection among hospitalized children in Cuba. Ann. Trop. Med. Parasitol., 105 (1) : 57-64 .

Bermudez-Cruz, R.M. ; Ortega-Pierres, G. ; Ceja, V. ; Coral-Vazquez, R. ; Fonseca, R. ; Cervantes, L. ; Sanchez, A. ; Depardon, F. ; Newport, G. and Montanez, C. (2004) . A 63 kDa VSP9B10A-like protein expressed in a C-8 *Giardia duodenalis* Mexican clone. Arch. Med. Res., 35: 199 - 208 .

Bernander, R. and Svärd, S.C.(2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. Cell Microbiol., 3(1) : 55 - 62 .

Bertram, M.A. (1983). A comparison of isozymes of Five axenic *Giardia* isolates. J. Parasitol., 69(5) : 793-801.

Bogitsh, B.J. ; Carter, C. E. and Oeltman, T.N. (2005) . Human Parasitology . 3rd ed., Elsevier Acad. Press., London : 84-89 .

Botero-Garcès, J.H. ; Garcia-Montoya, G.M. ; Grisales-Patino, D. ; Aguirr-Acevedo, D.C. and Álvarez-Uribe, M.C.(2009). *Giardia intestinalis*

and nutrition status in children participating in the complementary nutrition program, Antioquia, Colombia, May. to October 2006 . Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo., 51 (3) : 155 – 162 .

Brody, J.R. and Kern, A.P. (2004) . History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis . Anal . Bio . Chem., 333(1) :1 - 13.

Buret, A.G. (2008). Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalius* . Parasite , 15 : 261-270 .

Buret, A. ; den Hollander, N. and Wallis, P. (1991). Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. J. Infect. Dis., 162 : 231-237.

Byrd, L. G. ; Conrad, J. T. and Nash, T.E. (1994) . *Giardia lamblia* infections in adult mice . Infect. Immun., 62: 3583 – 3585 .

Caccio,S.M. ; Beck, R. ; Almeida, A. ; Bajer, A. and Pozio, E. (2009). Identification of *Giardia* species and *Giardia duodenalis* assemblages by sequence analysis of the 5.8Sr DNA gene and internal transcribed spacers. Parasitology : 1 - 7 .

Casadevall A, and Pirofski, L. (2001). Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. J. Infect Dis., 184: 337 - 344 .

Cetinkurt, A. and Jurgen, B. (2005). Sodium hydroxide. Ullmann's Encyclopedia of Industrial chemistry . Weinheim wiley Com., London : 345 p.

Cheeramakara, C. ; Nontprasert, A.; Siripanth, C. ; Tanomsak, W. ; Chularerk, U. ; Sucharit, P. and Areekul, S. (2004). The hematological status, plasma vitamin B12 and folic acid levels and intestinal pathology in rats infected with *Giardia lamblia* . Southeast Asian . J. Trop. Med. Pub. Health, 35 (4) : 811 – 816 .

Chin, J. (2000). Control of communicable diseases: Manual, 17th edn., Amer. Pub. Heal. Assoc., Washington : 624 pp.

Chernin, J. (2000) .Parasitology .Taylor & Francis e - library,London :142 pp.

Collins, R.F. and Edwards, L.D. (1981) . Prevalence of intestinal helminthes and protozoans in a rural population segment of the Dominican Republic. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75 (4) : 549 – 551 .

Cox, F. E. G. (1993) . Modern Parasitology a Textbook of Parasitology . 2nd edn. Black well Science Ltd., Massachusetts : 164 pp.

David, E.B. ; Coradi, S.T. ; Oliveira-Sequeira, T.C.G. ; Ribolla, P.E.M. ; Katagiri, S. and Guimaraes, S. (2011). Diagnosis of *Giardia* infections by PCR-based methods in children of an endemic area. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis, 17 (2) : 210 - 215.

de Lalla, F. ; Rinaldi, E. ; Santoro, D. ; Nicolin, R. and Tramarin, A. (1992). Outbreak of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* infections in travelers returning from the Tropics . Infection. , 20(2) : 78 – 82 .

De Morais, M. B. ; Suzuki, H. U. ; Corral, J. N. ; Machado, N. L. and Neto, U. F.(1996). Asymptomatic Giardiasis does not affect iron absorption in children with iron deficiency anemia . J. Amer. Coll. Nutr., 15 (5) : 434 - 438 .

Demirci, M.;Delibas,N. ; Altuntas, I. ; Oktem, F. and Yonden, Z. (2003). Serum Iron , Zinc and Copper levels and Lipid Peroxidation in children with chronic Giardiasis . J.Health Popul. Nutr., 21(1): 72 -75.

Dib, H.H. ; Lu, S.Q. and Wen, S.F.(2008) . Prevalence of *Giardia lamblia* with or without diarrhea in South East Asia and the Far East . Parasitol. Res., 103 : 239 – 251.

Dorea, R.C.C. ; Salata, E. ; Padovani, C.R. and dos Anjos, G.L. (1996) . Control of parasitic infections among school children in the periurban area of Botucatu , Sao Paulo, Brazil. Riv. Soc. Braz. Med. Trop., 29 (5) : 425 – 430 .

Dos Santos, J. and Vituri, C. (1996). Some hematimetric finding in human *Giardia lamblia* infection. Rev. Inst. Med. Trop . Sao Paulo, 38(2): 91-95.

Eckmann, L.(2003). Mucosal defences against *Giardia* . Parasite Immunol., 25 : 259 – 270 .

Eckmann, L. and Gillin, F.D. (2001) . Microbes and Microbial Toxins : Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions . I. pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen- dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 280 (1): 1- 6 .

Ejiofor, O.S.; Onyire, A. and Ofomata, J.A. (2011).The prevalence of *Giardia lamblia* in children presenting with diarrhoea at secondary health facility in Awka, South-East Nigeria. Europ. J. Sci . Res., 57(4):529-532 .

Ekdahl, R. and Andersson, Y. (2005). Imported giardiasis : impact of international travel, Immigration and adoption. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 72(6) : 825-830 .

El-Badry, A.A. ; Al-Ali, K.H. and Mahrous, A.R.S. (2010). Molecular identification & prevalence of *Giardia lamblia* & *Cryptosporidium* in duodenal aspirate in AL-Madinah. J. Med. Biomed. Sci., 47 - 52 .

Ellam, H. ; Verlander, N. Q. ; Lamden, K. ; Cheesbrough, J .S. ; Durband, C. A. and James, S. (2008). Surveillance of giardiasis in Northwest England 1996-2006: impact of an enzyme immunoassay test . Euro Surveill., 13(37): 189 pp.

El-Naggar, B.A. ; El-Tork, S.A. and Morsy, T.A. (1978) . Parasitic infestations among preschool and school aged children. J.Egypt. Publ. Health Assoc., 53 (5 & 6) : 374 – 378 .

El-Sayad, M. H. ; El-Taweel, H. A. and El-Banna, S. G. (2011). Evaluation of some micronutrients, antioxidant biomarkers total antioxidant capacity in human giardiasis. P.U.J., 4(2) : 211 – 218 .

Erdman, D.D. (1981) . Clinical comparisom of ethyl acetate and diethyl in the formaline-ether sedimentation techniques . J. Clin. Microbiol., 14 : 483 – 485 .

Espelage, W.; Heiden, M.; Stark, K. and Alpers, K. (2010) . Characteristics and risk factors for symptomatic *Giardia lamblia* infections in Germany . Bio. Med. Cent. Publ. Health , 10 : 41- 49 .

Farthing, M.J.G. ; Pereira, M.E.A. and Keusch, G.T. (1986) . Description and characterization of a surface Lectin from *Giardia lamblia* . Infect. Immun., 51(2) : 661 – 667.

Faust, E. C. ; Russell, P. F. and Jung, R. C. (1970) . Craig and Faust's clinical parasitology , 8th edn., Lea & Febiger , Philadelphia : 890 pp .

Feng, Y. and Xiao, L. (2011) . Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clinic. Microbiol. Rev., 24(1) : 110-140.

Filice, (1952). Studies of the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Univ. Calif. Publ. Zool., 57: 53-146.

Flanagan, P. A. (1992) . *Giardia* diagnosis, clinical course and epidemiology: A review. Epidemiol . Infect, 109 (1) : 1–22.

Ford, B. J.(2005). The Discovery of *Giardia*. Microscope, 53(4): 147-153.

Foronda, P. ; Bargues, M.D.; Abreu – Acosta, N.; Periago, M.V.; Valero, M . A . ; Valladares , B. and Mas – Coma, S.(2008). Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt .Parasitol. Res., 103 : 1177 – 1181.

Garcia, L. S. and Ash, L. R. (1975) . Diagnostic parasitology : Clinical laboratory manual. C. V. Mosby Co., Saint Louis : 112 pp.

Garcia, L.S. and Shimizu, R.Y. (1997). Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. J. Clin. Microbiol., 35: 1526 – 1529 .

Garcia, L.S. ; Shimizu, R.Y. and Bernard, C.N. (2000) . Detection of *Giardia lamblia ,Entamoeba histolytica/ Entamoeba adispar* ,and *Cryptosporidium parvum* Antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. J. Clin .Microbiol., 38(9) : 3337 – 3340 .

Gardner, T.B. and Hill, D.R. (2001). Treatment of giardiasis. Clin. Microbiol. Rev., 14 (1) : 114 – 128 .

Garg, P.K. ; Perry, S. ; Dorn, M. ; Hardcastle, L. and Parsonnet, J.(2005). Risk of intestinal helminth and protozoan infection in a refugee population. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 73(2): 386 - 391 . (Abstract) .

Gasser, R.B. ; Eckert, J. and Rohere, L.(1987). Isolation of *Giardia* from Swiss cattle and cultivation of trophozoites *in vitro*. Parasitol. Res., 73: 182-183 .

Gbakima, A.A. ; Konteh, R. ; Kallon, M. ; Mansaray, H. ; Sahr, F. ; Bah, Z.J. ; Spencer, A. and Luckay, A. (2007). Intestinal protozoa and intestinal helminthic infections in displacement camps in Sierra Leone. Afr. J. Med. Sci., 36(1): 1- 9 (Abstract).

Gillespie, S.H. and Pearson, R.D.(2001). Principles and practice of clinical Parasitology . John Wiley & Sons, LTD., New York : 630 pp .

Hakim, G. D.; Kizltas, S. ; Cifitci, H. ; Goktas, S. and Tuncer, I. (2011). The prevalence of *Giardia intestinalis* in Dyspepsia and diabetic patients. Int. Schol. Res. Net. Gastroenterol., 201: 105 – 108 .

Hanevik, K. ; Dizdar, V. ; Langeland, N. and Hausken, T. (2009). Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. Bio.Med.Cent. Gastroenterol., 9: 27 - 30 .

Haque, R.(2007) . Human intestinal parasites . J. Health Popul. Nut., 25 (4) : 387 – 391 .

Helmy, M.M. ; Abdel-Fattah, H.S. and Rashed, L. (2009) . Real-Time PCR/RFLP assay to detect *Giardia intestinalis* genotypes in human isolates with diarrhea in Egypt . J. parasitol., 95(4) : 1000 – 1004 .

Hetsko, M .L. ; McCaffery, J .M. ; Svard, S. G. ; Meng, T. C. ; Que, X. and Gillin, F. D.(1998) . Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia in vitro*. Exp. Parasitol. 88 : 172–183.

Heyworth, M.F .(1989) .Intestinal IgA responses to *Giardia muris* in mice depleted of helper T lymphocytes and in immunocompetent mice. J. Parasitol., 75: 246 - 251 .

Hill , D.R. (2001) . *Giardia lamblia* . In : Gillespie, S. & Pearson, R.D. (eds.), Principles and practice of clinical parasitology. John Wiley & Sons Ltd., New York : 219 – 242 .

Hill, D. R. and Pohl, R. (1990) . Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by murine Peyer's Patch macrophages . Infect. Immun., 58 : 3202- 3207.

Hjelt, K. ; Paerregaard. A. and Krasilnikoff, P.A. (1992). Giardiasis heamatological status and the absorption of Vitamin B12 and Folic acid . Acta Paediat ., 81 : 29-34 .

Holberton, D.V. (1973). Mechanism of attachment of *Giardia* to the wall of the small intestine. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 67: 29 – 30 .

Homan, W.C. and Mank, T.G. (2011). Human giardiasis : genotype linked differences in clinical symptomatology. Int. J. parasitol., 31: 822-826.

Huetink, R.E.C. ; Van der Giessen, J.W.B . ; Noordhuizen, J.P.T.M. and Ploeger, H.W. (2001). Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm . Vet. Parasitol., 102: 53 – 67.

Ibrahim, A. Q. (2012). Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* in children in Kadhmiyah hospital. Iraqi. J. Vet. Med., 36(1) : 32-36 .

Ibrahim, L. ; Teoh, K. Y. ; Wan, K.L. ; Normaznah and Rahmah, M. (2007). Astudy on PCR-RFLP of *Giardia duodenalis* in Malaysia. Malaysian J. Pathol., 29 (1) : 25 – 31 .

Ichhpujani, R. L. and Bhatia, R. (1994). Medical Parasitology. Jaypee Bros . Med . Publ ., New Delhi : 384 pp .

Isaac-Renton, J. L. ; Shahriari, H. and Bowie, W. R. (1999) . Comparison of an *in vitro* method and an *in vivo* method of *Giardia* excystation . Appl. Environ. Microbiol., 58 : 1530 – 1533 .

Ivanov, A. I. (2010). *Giardia* and Giardiasis . J. Vet. Med., 13(2) : 65-80 .

Jaeffer, H.S.(2011).Prevalence of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar* among children in Al-Shulae and Al-Khadimya–Baghdad–Iraq. J. Uni. Anb. Pure. Sci., 5(2) : 65-70.

Janoff, E.N. ; Craft, J.C. ; Pickering, L.K. ; Novotny, T. ; Blaser, M.J. ; Knisley, C.V. and Reller, L.B. (1989) . Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by detection of parasite-specific antigens. J. Clin. Microbiol., 27 (3) : 431– 435 .

Jarroll, E. L. and Paget, T. A. (1995) . Carbohydrate and amino acid metabolism in *Giardia* . A review . Folia Parasitol ., 42 : 81 – 89 .

Jassan, B.A. ; Al-Dujaily, A.A. and Saleh, M.M. (1986) . Prevalence of intestinal parasites in schoolchildren of Kirkuk city. Iraq. J. Biol. Sci. Res., 17 (2) : 119 – 125 .

Jenkins, M.C. ; O'Brien, C.N. ; Murphy, C. ; Schwarz, R. ; Miska, K. ; Rosenthal, B. and Trout, J.M.(2009) . Antibodies to the ventral disc protein delta-giardin prevent *in vitro* binding of *Giardia lamblia* trophozoites. J. Parasitol., 95: 895 – 899 .

Jones, E.G. and Brown, W.R. (1974). Serum and intestinal fluid immunoglobulins in patients with giardiasis . Dig. Dis., 19 : 791- 796.

Júlio, C. ; Vilares, A. ; Oleastro, M. ; Ferreira, I. ; Gomes, S. ; Monteiro, L. ; Nunes, B. ; Tenreiro, R. and Ângelo, H. (2012). Prevalence and risk

factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. Parasit. Vect., 5 : 22 - 30 .

Kabnick, K. C.(1990). In situ analysis reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. J. Cell. Sci., 95(3) : 353-360.

Kassem, H.H. ; Zaed, H.A. and Sadaga, G.A. (2007). Intestinal parasitic infection among children and neonatus admitted to Ibn-Sina Hospital, Sirt, Libya. J. Egyp. Soc. Parasitol., 37(2): 371-380. (Abstract) .

Kaur, H. ; Ghosh, S. ; Samra, H. ; Vinayak, V.K. and Ganguly, N.K .(2001).Identification and characterization of an excretory-secretory product from *Giardia lamblia*. Parasitology., 123: 347 – 356 .

Keystone, J.S. ; Krajden, S. and Warren, M.R.(1978). Person-to-person transmission of *Giardia lamblia* in day-care nurseries. C.M.A. J., 119 : 241-250.

Khan, M.U. ; Amir, S.E. ; Eid, O.M. and Aggerwal, S. (1989) . Prevalence of intestinal parasites among patients in the Abha region. Ann. Saudi Med., 9 (5) : 471 – 474 .

Kilic, E. ; Saragmen, R. ; Miman, O. and Yazar, S. (2010) . Evaluation of serum copper level during *Giardia intestinalis* infection . Afr. J. Microbiol. Res., 4 (10) : 1013 – 1015 .

Knaippe, F.(1990). *Giardia lamblia* attachment to biological and inert substrates. Microsc. Elect. Biol. Cell., 14: 35 – 43.

Kudo ,R.R. (1966) . Protozoology , 5th edn. , Charles C . Thomas publ . , Springfield : 1174 pp .

Lalle, M.(2010). *Giardia duodenales* 14-3-3 protein is polyglycylated by atubulin tyrosin ligase-like member and deglycylated by two metallocarboxy peptidases . J. Biol. Chem., 286 (6) : 4471 – 4484 .

Lalle, M. ; de Regalbono, A.F. ; A. ; Poppi, L. ; Nobili, G. ; Tonanzi, D. ; Pozio, E. and Caccio, S.M. (2007) . A novel *Giardia duodenalis* assemblage A subtype in fallow deer. J. Parasitol., 93(2) : 426-428.

Laupland, K.B. and Church, D.L.(2005). Population - based laboratory Surveillance for *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. infections in a large Canadian health region . Bio. Med. Cent. Infect. Dis., 5: 72-79 .

Lebbad, M. ; Ankarklev, J. ; Tellez, A. ; Leiva, B. ; Andersson, J.O. and Svard, S. (2008) . Dominance of *Giardia* assemblage B in Leon, Nicaragua. Acta Trop., 106: 44- 53 .

Lebbad , M. (2010) . Molecular Diagnosis and characterization of two intestinal Protozoa : *Entamoeba histolytica & Giardia intestinalis* .Ph. D. thesis Swedish Instit. Infect. Dis. Cont., karolinska Instit. 24 pp.

Lee, J. ; Lee, J. ; Park, S. ; Yong,T. and Hwang , U. (2006) . Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacer (IGS)-based PCR. Korean J. Parasitol., 44(4) : 343 – 353 .

Legesse, M. and Erko, B. (2004) . Prevalence of intestinal parasites among schoolchildren in a rural area close to the southeast of Lake Langano, Ethiopia. Ethiop . J . Health. Dev., 18 (2) : 116 – 120 .

Levine, N. D. (1985). Veterinary Protozology . Lowa state University press, Iowa, USA : 97-100 .

Levinson, W. and Jawetz, E. (2000) . Medical Microbiology & Immunology : Examination & Board Review, 6th Ed. McGraw – Hill Companies , New York : 582 pp .

Lim , Y.A.L. ; Iqbal, A. ; Surin, J. ; Sim, B.L.H. ; Jex, A.R. ; Nolan, M.J. ; Smith, H.V. and Gasser, R.B.(2011). First genetic classification of *Cryptosporidium* and *Giardia* from HIV/AIDS patients in Malyasia. Infec. Genet. Evol., 11: 968-974 .

Mahbubani, M. H. ; Bej, A. K . ; Perlin, M. H. ; Schaefer, 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 (1) : 74 – 78 .

Mahmud, M.A. ; Chappell, C. ; Hossain, M.M. ; Habib, M. and Dupont, H.L.(1995). Risk factors for development of first symptomatic

Giardia infection among infants of a birth cohort in rural Egypt. Amer. J. Trop. Med. Hyg.., 53(1) : 84 - 80 .

Maniatis, T. ; Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) . Molecular Cloning 4th edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York : 221 pp .

Mank, T. (2005). Parasitology , The diagnosis and clinical importance of Giardiasis. Clin.Lab.Internat.,46 : 1 – 3 .

Mank, T.G. ; Zaat, J.O. and Deelder, A.M.(1997). Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. , 16 : 615 - 619 .

Manning, G. ; Reiner, D.S. ; Lauwaet, T. ; Dacre, M. ; Smith, A. ; Zhai, Y.; Svard, S. and Gillin, F. D. (2011) . The minimal kinome of *Giardia lamblia* illuminates early kinase evolution and unique parasite biology. Genom. Biol., 12 : 66 – 85 .

Marangi, M. ; Berrilli, F. ;Otranto,D. and Giangaspero, A. (2010).Genotyping of *Giardia duodenalis* among children and dogs in a closed socially deprived community from Italy. Zoonos. Publ. Heal., 57: e54– e58 .

Markell, E.K. ; Voge, M. and John, D. T. (1986) . Medical parasitology , 6th edn. , W. B . Saunders Co., Philadelphia : 383 pp.

Markell, E.K.; John, D.T. and Krotoski, W.A.(1999). Markell and Voge's medical parasitology, 8th edn.,W.B. Saunders Co.,Philadelphia:501 pp.

Marquardt ,W.C. ; Demaree , R.B. and Grieve , R.B. (2000) . Parasitology and vector Biology . 2nd edn . Academic press, Philadelphia. 702 pp .

McGlade, T. R. ; Robertson , I. D. ; Elliot , A. D. and Thompson , R.C.A. (2003) . High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR . Vet. Parasitol., 110: 197 – 205 .

Mehraj, V. ; Hatcher, J. ; Akhtar, S. ; Rafique, G. and Beg, M.A. (2008). Prevalence and factors associated with intestinal parasitic infection among children in an Urban Slum of Karachi. Plos. One, 3 (11) : 3680 - 3690.

Mellingen, K.M ; Midtun, A. ; Hanevik, K. ; Eide, G . E ; Søbstad, Ø . and Langeland, N. (2010) . Post epidemic giardiasis and gastrointestinal symptoms among preschool children in Bergen, Norway. A cross-sectional study. Bio. Med. Cent. Pub. Health., 10 : 163 – 171 .

Meyer, E. A. (1976) . *Giardia lamblia* : isolation and axenic cultivation. Exp. Parasitol., 39 : 101–105.

Meyer, E.A. and Jarroll, E.L. (1980) . Giardiasis . Amer . J. Epidemiol . , 3(1) : 1– 12 .

Millet, V.E. ; Spencer, M.J. ; Chapin, M.A. ; Garcia, L.S. ; Yatabe, J.H. and Stewart, M.E. (1983) . Intestinal protozoan infection in a semicommunal group. Amer. J. Trop . Med. Hyg., 32 (1) : 54 – 60.

Minvielle, 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. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 103(1) : 98 - 103 .

Miotti, P.G. ; Gilman, R.H. ; Santosham, M. ; Ryder, R.W. and Yolken, R.H. (1986) . Age-related rate of seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. J. Clin. Microbiol., 24 (6) : 972 - 975.

Miyata, A. ; Hasegawa, H. ; Bello, M.C. and Baron, R.(1995). Intestinal parasitic infections in some rural and urban areas of the Dominican Republic. Jap. J. Trop. Med. Hyg., 23(3) : 169-176 . (Abstract) .

Mohamadnezhad, F.; Ghaffarifar, F. and Dalimi, A.(2008) . *In vitro* effects of metronidazole and Albendazole on *Giardia lamblia* isolated from Iranian patients. Iran. J. parasitol., 3(2) : 38 – 42 .

Mohammed-Mahdy, A.K. ; Surin, J. ; Wan, K.L. ; Mohdadam, A.; Al-Mekhlafi, M.S.H. and Lim, Y.A.L.(2009). *Giardia intestinalis* genotypes: R. 3K factors and correlation with clinical symptoms. Acta Trop., 112(1) : 67-70 .

Molan, A.L. and Farag, A.M. (1989) . Prevalence of intestinal parasites in school children of Arbil, Northern Iraq. Saudi Med. J., 10(2):107- 110.

Molina, N. ; Polverino, D. ; Minvielle, M. and Basualdo, J. (2007). PCR amplification of triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin-fixed feces . Rev. Latin. Microbiol., 49 : 6 – 11 .

Monajemzadeh,S.M. and Monajemzadeh, M.(2008). Comparison of iron and heamatological indices in *Giardia lamblia* infection before and after treatment in 102 children in Ahwaz, Iran. Med. Sci. Monit., 14(1) : 19-23.

Monis, P.T. ; Andrews, R.H. ; Mayrhofer, G. and Ey, P.L. (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis.* Mol. Biol. Evol., 16: 1135-1144.

Monis, P.T. ; Caccio, S.M. and Thompson, R.C .(2009) . Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. Trend. Parasitol., 25: 93 – 100.

Morsy, T.A. ; Farrag, A.M.K. ; Sabry, A.H.A. ; Salama, M.M.I. and Arafa, M.A.S. (1991) . Ecto and endoparasites in two primary schools in Qualyob city , Egypt. J. Egypt. Soc. Parasitol., 21 (2) : 391 – 401 .

Mumtaz, S. ; Siddiqui, H. and Ashfaq, T. (2009) . Frequency and risk factors for intestinal parasitic infection in children under five years age at a tertiary care hospital in Karachi . J. Pak .Med. Assoc., 59(4):216- 219.

Muniz–Junueira, M. I. and Queiroz, E. F. O.(2002) . Relationship between protein energy malnutrition, Vitamin A and parasitosic in children living in Brasilia. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 35 (2) : 133 – 141 .

Musaiger, A.O. and Gregory, W.B. (1990) . Change in parasitic infections among school children in Bahrain , 1980 – 1986: A preliminary study . Saudi Med. J., 11 (2) : 113 – 115 .

Nash, T. E. (1997) . Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. Philos. Trans. Roy. Soc. London Ser. B., 352:1369–1375.

Nash, T.E. ; Keister, D. ; Dame, J. B. ; Conrad, J. D. and Gillin, F.D.(1985). Restriction-endonuclase analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtain from human and animal. J. Infect. Dis., 15(1) : 64-73 .

Newman, M.G. and Nisengard, R.(1988).Oral Microbiology and immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphia : 532 pp .

Nikaeen, M.; Mesdaghinia, AR.; Tehrani, M.J.; Rezaian, M. and Vaezi, F. (2003) . Sensitive detection of *Giardia* cysts by polymerase chain reaction (PCR) . Iran. J. Publ. Health., 32 (1) : 15 – 18 .

Nkrumah, B. and Nguah, S.B.(2011) . *Giardia lamblia*: amajor parasitic cause of childhood diarrhoea in patients attending a district hospital in Ghana. Parasit. Vect., 4 : 163 - 169 .

Oda, T. ; Kawabata , M. and Uga, S. (2005). Detection of *Giardia* cysts in sewage and estimation of giardiasis prevalence among in habitants in Hyogo prefecture, Japan. Trop. Med. Health, 33(1) : 1-5 .

Olsen, O. W. (1974) . Animal parasites : Their life cycles and ecology , 3rd edn., Univ. Park Press, Baltimore : 562 pp .

Ouattara, M.; Guessan, N.A. ; Yapi, A. and Goran, N.E.K. (2010).Prevalence and spatial distribution of *Entamoeba histolytica / dispar* and *Giardia lamblia* among school children in Agboville area (Cote d lvoire) . Plos Negl. Trop. Dis ., 4(1): e574 – e578 .

Owen, R.L.(1980). The immune response in clinical and experimental giardiasis. Trans. Roy. Soci. Trop. Med. Hyg., 74: 443-445 .

Owen, R. L. ; Allen, C. L. and Stevens, D. P. (1981) . Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in Peyer's patch epithelium in mice . Infect. Immun., 33 : 591 – 601 .

Payne, P.A. and Artzer, M.(2009). The biology and control of *Giardia* spp. and *Trichomonas* foetus. Vet. Clin. Small Anim., 39 : 993-1007 .

Pereira, M. deG. ; Atwill, E.R. and Barbosa, A.P. (2007). Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia State, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo, 49(3): 193-145.

Qadri, S.M.H. and Khalil, S.H. (1987) . Intestinal parasites : Incidence and etiology in over 1,000 patients at King Faisal Specialist Hospital in Riyadh. Ann. Saudi Med., 7 (3) : 207 – 211 .

Raof, S.A. and Abdul-Rahman, N.H. (2011). Prevalence of *Blastocystes hominis* and *Giardia lamblia* parasites in patients of four regions in East-South Baghdad. Iraqi J. Vet. Med., 35(2) : 74-84 .

Rayan, P. ;Varghese, S. and McDonnell, P.A.(2010). Geographical location and age affects the incidence of parasitic infections in school children. Indian. J. Pathol. Microbiol., 53(3) : 498-502 . (Abstract) .

Raza, H.H. and Sami, R.A. (2009). Epidemiological study on gastrointestinal parasites among different sexes, occupations and age groups in Sulaimani District. J. Duhok Univ., 12(1): 317-323.

Read, C. ; Walters, J. ; Robertson, I.D. and Thompson, R.C. (2002). Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhrea. Int. J. Parasitol., 32: 229-231.

Reiner, D. S. ; Hetsko, M. L. ; Meszaros, J. G . ; Sun, C. Morrison, H. G. ; Brunton, L. L. and Gillin, F. D. (2003) . Calcium signaling in excystation of the early diverging eukaryote, *Giardia lamblia* . J. Biol. Chem., 278 (4) : 2533 – 2540 .

Reinthaler, F.F. ; Mascher, F. ; Klem, G. and Sixl, W. (1988) . A survey of gastrointestinal parasites in Ogun State , southwest Nigeria. Ann. Trop. Med. Parasitol., 82 (2) : 181 – 184 .

Rendtorff, R.C. (1954). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. Am. J. Hyg., 59: 209-220 .

Roberts, L.S. and Janovy, J.(2000). Gerald D. Schimidt & Larry S. Roberts, Foundation of parasitolog, 6th edn. McGraw Hill Com., New York: 679 pp.

Roberts-Thompson, I.C. ; Stevens, D.P. ; Mahmoud, A.A.F. and Warren, K.S. (1976a).Acquired resistance to infection in an animal model of giardiasis . J. Immunol., 117 : 2036-7 .

Roberts-Thompson, I.C. ; Stevens, D.P. ; Mahmoud, A.A.F. and Warren, K.S. (1976b).Giardiasis in the mouse: An animal model. Gastroenterology., 71: 57- 61.

Sackey, M. E.(2001). Intestinal parasitic infections : Prevalence, risk factors and consequences for child growth, Iron status and development in rural Ecuador. M. Sci. thesis, Fac. Virginia. Polytechnic. Stat. Uni : 89 pp.

Saksirisampant, W. ; Kulkumthorn, M. and Janpla, S. (2006) . The prevalence of intestinal parasitic infections among school children in the central region of Thailand . J. Med. Assoc. Thai., 89 (11) : 1928 – 1933.

Salzer, J.S.; Rwego, I. B. ; Goldberg, T. L. ; Kuhlenschmidt, M. S. and Gillespie, T. R. (2007). *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. infections in primates in fragmented and undisturbed forest in Western Uganda. J. Parasitol., 93 (2) : 439 – 440 .

Satoskar , A.R. ; Simon , G.L. ; Hotez , P.J. and Tsuji , M. (2009). Medical Parasitology. Landes Bioscience. Com., London : 320 pp .

Savona-Ventura, C. (2002) . Parasites and pests of medical significance in the maltese environment- a historical review of culprit species. Cent. Mediterran. Nat., 3(4) : 149 – 152 .

Schuurman, T. ; Lankamp, P. ; Van Belkum, A. ; Kooistra-Smid, M. and Van Zwet, A. (2007) . Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. Clin. Microbiol. Infect., 13(12) : 1186-1191 .

Schmidt, G.D. and Roberts, L.S. (1989). Foundations of parasitology, 4th edn., Times Mirror/Mosby Coll. Publ., Saint Louis : 750 pp.

Shalaby, I.; Gherbawy, Y. and Banaja, A. (2011) . Molecular characterization of *Giardia* parasite isolated from stool samples collected from different hospitals in Taif City (Saudi Arabia) . Trop. Biom., 28(3): 487– 496.

Sharif, F.A.(2002). Prevalence and seasonal fluctuations of common intestinal parasites in Khan Younes , 1996-2000. J. Islam. Uni. Gaza., 10 (2) : 1- 11 .

Shnawa, B.H. (1995). Biological and immunological studies on *Giardia lamblia* (Stiles, 1915). Ph. D. Thesis, Coll. Sci., Univ. Basrah: 102 pp.

Shubair, M.E. ; Yassin, M.M. ; Al-Hindi, A.L. ; Al-Wahaidi, A.A. ; Jadallah, S.Y. and Abushaaban, N.(2000). Intestinal parasites in relation to haemoglobin level and nutritional status of school children in Gaza . J. Egypt . Soc. Parasitol., 30 (2) : 365 – 75 .

Shurie, H.H.M. and Srivatsan, B.P.(1996). Prevalence of intestinal parasites in newly appointed employees at Jebel Ali free zone, Dubai, U.A.E. J. Bahrain Med. Soc., 8(1) : 20 - 24 .

Siddiqui, M.A. (1981) . The prevalence of human intestinal parasites in Al-Baha , Saudi Arabia : A preliminary survey. Ann. Trop. Med. Parasitol., 75 (5) : 565 – 566 .

Sousa, M.C. ; Goncalves, C.A. ; Bairos, V.A. and Poiares-Da-Silva, J .(2001). Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. Clin. Diag. Lab. Immunol., 8: 258– 265 .

Souza, S.L. ; Gennari, S.M. ; Richtzenhain, L.J. ; Pena, H.F. ; Funada, M.R. ; Cortez, A. ; Gregori, F. and Soares, R.M. (2007). Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. Vet. Parasitol., 149: 258 -264 .

Srikanth, R. and Naik, D. (2004). Prevalence of giardiasis due to waste water rease for agriculture in the subarbs of Asmar city, Eritrea. Int. J. Environ. Health. Res., 14(1) : 43-52 .

Stager, S. and Muller, N.(1997). *Giardia lamblia* infections in B- cell - deficient transgenic mice . Infect. Immun., 65 : 3944 - 3946.

Stevens, D. P. and Frank, D. M. (1978) . Local immunity in murine giardiasis : is milk protective at the expense of maternal gut. Trans. Assoc. Amer. Physic., 91 : 268- 72 .

Sun, T. (1982). Pathology and clinical features of parasitic diseases. Masson Publ., Inc., New York: 342 pp.

Tashima, N.T. ; Simoes,M.J.S. ; Leite,C.Q.F. ; Fluminhan, A. ; Nogueira, M.A. and Malaspina, A.C.(2009). Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of presidente prudente, Sao Paulo, Brazil.Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo., 51(1) : 19 - 24 .

Tasic, N.M. ; Tasic, S. ; Tasic, A. and Zdravkovic, D. (2008). Modern diagnostics of giardiasis . Acta Fac. Med. Naiss., 25 (2) : 97-101.

Teixeira, J.C. ; Heller, L. and Barreto, M.L. (2007) . *Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil. Cad. Saúd. Públ. Rio de Janeiro, 23 (6) : 1489 - 1493 .

Teodorovic, S. ; Braverman, J. M. and Elmendorf, H.G.(2007). Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates . Eukaryot. Cell., 6(8) : 1421-1430 .

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

Thompson, R. C. ; Hopkins, R. M. and Homan, W. L. (2000). Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. Parasitol. Tod., 16(5): 210–213.

Tigabu, E. ; Petros, B. and Endeshaw, T. (2010) . Prevalence of Giardiasis and Cryptosporidiosis among children in relation to water sources in Selected Village of Pawi Special District in Benishangul-Gumuz Region, Northwestern Ethiopia. Ethiop. J. Health Dev., 24 (3) : 205 – 213 .

Valverde, J. G. ; Gomes-Silva, A. ; De Carvalho Moreira, C.J. ; Leles De Souza, D. ; Jaeger, L.H. ; Martins, P.P. ; Meneses, V.F. ; Boia, M.N. and Carvalho-Costa, F.A. (2011). Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian, Amazon. Ann. Trop. Med. Parasitol.,105(6): 413-424. (Abstract) .

Van der Giessen, J.W.B. ; de Vries, A. ; Roos,M. ; Wielinga, P. ; Kortbeek, L.M. and Mank, T.G.(2006) . Genotyping of *Giardia* in Dutch patients

and animals : A phylogenetic analysis of human and animal isolates. Intern. J. Parasitol., 36 : 849 – 858 .

Verweij, J. J. ; Blange, R.A. ; Templeton, K. ; Schinkel, J. ; Brienen, E.A. T. ; Rooyen, M. A. A.V. ; Lieshout, L. V. and 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. Microbial., 42 (3) :1220 – 1223 .

Wakid, M. H. ; Azhar, E. I. and Zafar, T.A. (2009) . Intestinal parasitic infection among food handlers in the holy city of Makkah during Hajj season 1428 Hegira (2007G). J. King. Abd. Uni. Med. Sci., 16 (1) . 39 - 52 .

Walls, C.D.(2010). Target in the process of attachment in *Giardia lamblia* pathogenesis : A new approach in *Giardia* drag discovary. Ph. D. Thesis, Bio. Gradut. Sch. Art Sci, Georgtown Univ. : 155 pp .

Wang, C.H. ; Su, L.H. and Sun, C.H. (2007) . A Novel ARID/Bright-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein 1Gene in *Giardia lamblia* . J. Biol. Chem., 282(12) : 8905 – 8914 .

Wani, S.A. ; Ahmad, F. ; Zargar, S.A. ; Ahmad, Z. ; Ahmad, P. and Tak, H. (2007). Prevalence of intestinal parasites and associated risk factors among school children in Srinagar City, Kashmir, India. J. Parasitol., 93(6) : 1541-1543 .

WHO (1981). Intestinal protozoan and helminthic infections : Report of a W.H.O. Scientific Group. W.H.O. Tech. Rep., Ser. 666 : 152 pp.

WHO (1987).Prevention and control of intestinal parasitic infections : Report of a W.H.O. Expert Committee. W.H.O. Tech. Rep., Ser: 749 – 786.

WHO (1991). Basic Laboratory methods in medical parasitology. World Health Organization, London : 261 pp.

WHO (1993). Guidelines on technologies for water supply systems in small communities. W.H.O., East. Med. Reg. Office, Cent. Environ. Health Act., Amman : 194 pp.

Wick , E.C. and Sears, C.L. (2010) . *Bacteroides* spp. and diarrhea. Curr. Opin. Infect. Dis., 23: 470 – 474 .

Wiesehahn, G.P. ; Lin dmark, D.G. ; Meyer, E.A. and Hallick. L.M.(1984). *Giardia lamblia* : autoradiographic analysis of nuclear replication. Exp. Parasitol., 58(1) : 94-100 .

Wintrobe, M.M. ; Thorn, G.W. ; Adams, R.D. ; Braunwald, E. ; Isselbacher, K.J. and Petersdorf, R. G. (1974) . Harrison's Principles of Internal Medicine, 7th ed . McGraw- Hill Ltd., Tokyo : 1034 – 1033 .

Yassin, M.M. ; Shubair, M.E. ; Al-Hindi, A.I. and Jadallah, SY. (1999). Prevalence of Intestinal parasites among school children in Gaza city, Gaza Strip. J. Egyp. Soci. Parasitol., 29(2) : 365-373.

Yoeli, M. ; Most, H. ; Hammond, J. and Scheinesson, G.P. (1972) . Parasitic infections in a closed community : results of a 10 – year survey in Willowbrook State school. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 66 (5) : 764 – 776 .

Younas, M. ; Shah, S. and Talaat, A. (2008) . Frequency of *Giardia lamblia* infection in children with recurrent abdominal pain . J. Pakist. Med. Assoc., 80 : 30 – 33.

Yu, L.Z. ; Rodney, C. W. B and Adam, D. (2002) .The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. Eukaryot. Cell, 1(2) : 191 – 199 .

Zaglool, D.A.M. ; Khodari, Y.A.W. ; Gazzaz, Z.J.; Dhafar, K.O.; Shaker, H.A.S. and Farooq, M.U. (2011) . Prevalence of intestinal parasites among patients of Al-Noor Specialist Hospital, Makkah, Saudi Arabia. Oman Med. J., 26(3): 182–185.

الملحق (1)

استمارة معلومات المريض

رقم الاستمارة [ ]

العمر: [ ] سنة

الجنس : ذكر [ ] أنثى [ ]

السكن : ريف [ ] مدينة [ ]

مصدر ماء الشرب : أسالة [ ] بئر [ ] نهر [ ] خزان [ ]

عدد أفراد الأسرة : [ ]

التحصيل الدراسي للأبوين : الأم : [ ] الأب : [ ]

هل سبق أن أصبت بالإسهال : نعم [ ] كلا [ ]

تأريخ الإصابة السابقة : [ ] عدد مرات تكرارها خلال اليوم : [ ]

عدد الاصابات السابقة : [ ]

هل أصيب سابقاً بأمراض غير الإسهال : نعم [ ] كلا [ ] الأمراض

-1

أو أنه مصاب حالياً بالمرض : نعم [ ] كلا [ ]

-2

-3

Summery

During the period From August 2011 to April 2012 an prospective study done to estimate the type and percentage of the intestinal parasitic in general and for *Giardia lamblia* infection in special way in outpatient in hospitals, medical centers and privet laboratories at Baqubah city .This study included collection of 657 stool samples from people age between less than 5 years old and 18 years old and more . Direct smear method was used to diagnosis the parasites. The result showed that there were seven types of intestinal organism, three of them were protozoa ,two of them were worms, as following : *Entamoeba histolytica* 26.94% , *Giardia lamblia* 8.371% , *Entamoeba coli* 1.978 , *Ascaris lumbricoides* 1.522% , *Enterobius vermicularis* 5,022% .

This study focused on prevalence of *Giardia lamblia*, the total percentage of infection was 8.371% , included 8.389% for female and 8.356% for male, there is no statistical difference between male and female. The present study recorded highest percentage of infection in ≥5≤18 years old group 22.857%, while the lower percentage of infection was in age group ≤5 years 6.288%. The results showed that there was increase in percentage of infection with *Giardia lamblia* with increasing of family number.The highest percentage of infection was recorded in family with 14 number and more (12.435%) while the lowest percentage of infection was appeared in family with 4-5 individuals (1.923%). Also the result showed high percentage of infection between people drink river water (17.647%), and lower percentage of infection was between those whom drink tap water (4.0%). There was no statistical difference percentage of infection between those who live in rural and urban (8.4%, 8.280%, respectively). There was relationship between percentage of infection and educational degree of the fathers and mothers, the highest percentage of infection was among these who fathers and mothers

were have non educational (12.565% , 11.764% , respectively) the lowest percentage of infection was among those whose fathers and mothers have high education (3.947%, 6.043% , respectively).

PCR technique was used for *Giardia* diagnosis and comparison between the result of this technique and direct smear method was done. High sensitivity for PCR method (94.736 %) compared with direct smear method (57.894%) was showed . The results of present study showed that the values of blood tests was as following : the mean of R.B.C was 4.323 10^9 /mm^3 in infected people and 4.740 10^9 /mm^3 in non infected people. The mean of WBC in infected individuals was 7.698 10^3 /mm^3 compared with 7.278 10^3 /mm^3 in non infected it was noted that there was very small increase in infected people. The value of hemoglobin was decrease in infected people (11.496 mg/dl) compared with non infected people (13.251 mg/dl). It was statistical increase recorded in lymphocytes in infected people compared with none infected (% 47.876, %32.868, respectively). Also it was shown that there was statistical increase in eosinophils in infected individuals compared with non infected individuals (%7.412 , %3.230, respectively). Neutrophils was less in infected individuals than in non infected (% 45.641,%56.451, respectively) with statistical differences .There was no difference in monocytes and basophiles between infected and non infected people.

This study showed that there was effect of infection on some biochemical values as following : Total bilirubin was (0.7127 umol/l) in infected and was (0.7600 umol/l) in none infected, Calcium was decrease in infected (1.383 mmol/l) compared with non infected (2.357 mmol/l). There was increase in value of uric acid in infected individuals (268.07 umol/l) compared with non infected individuals (253.2 umol/l). Albumin value was statistically decrease in infected individuals (32.156g/l) compared with non infected (40.971 g/l),

While the value of Iron was (11.678 umol/l) in infected compared with (14.908 umol/l) in non infected.

Ministry of Higher Education
And Scientific Research
University of Diyala
College of Education for Pure Science
Department of Biology

Molecular Investigation and the Prevalence of *Giardia lamblia* in Baquba city

A thesis

Submitted to the Council of the
College of Education for Pure Science University of Diyala in partial fulfillment
of the requirements for the degree of

Master of Science
in
Biology / Zoology (Parasitology)

By

Entesar Mehdi Hamd Al-Hussuny

(B.Sc. Biology , 2003)

Supervised by

Assis. Prof. Dr.
Dr. Nagham Y. Al-Bayati
College of Education for
Pure Science
University of Diyala

Assis. Prof. Dr.
Dr. Hadi Rahman Rasheed
College of Science
University of Diyala

September 2012 1433 Dhúl-Qa`dah

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعـــة ديالـــى

كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة مقارنة لثلاثة تقنيات في الكشف عن الفيروس العجلي من مرضى الإسهال و الحيوانات الداجنة

رسالة مقدمة الى

كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الأحياء المجهرية

مـن قبـل الطالبـة

أنسام داود سلمـــان

إشـــراف

الأستاذ الدكتور

عدنان نعمة عبدالرضا

كلية التربية للعلوم الصرفة–جامعة ديالى

الأستاذ المساعد الدكتور

عبدالرزاق شفيق حسن

كلية الطب البيطري–جامعة ديالى

صفر 1432هـ

كانون الثاني 2012 م

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعـــة ديالـــى

كلية التربية للعلوم الصرفة

بسم الله الرحمن الرحيم

{وعنده مفاتح الغيب لا يعلمها إلا هو ويعلم ما في
البر والبحر وما تسقط من ورقة إلا يعلمها ولا
حبة في ظلمات الأرض ولا رطب ولا يابس إلا في
كتاب مبين}

صدق الله العظيم

سورة الأنعام / الآية (59)

Supervisor Certification

We certify that this thesis **(A Comparative Study on Three Methods for Detection of Rotavirus from Patients with Diarrhea and Animals)** that presented by the student **(Ansam Dawood Salman)** was prepared under our supervision at the Department of Biology - College of Education for Pure Science – Diyala University as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of in Biology/Microbiology**.**

Supervisor	**Co-advisor**
Dr. Adnan Namma Abdul-Ridha	**Abdul- Razak Shafiq Hasan**
Professor	**Assist Professor**
Date: / /2012	**Date: / /2012**
College of Education for Pure Science **DiyalaUniversity**	**College of Veterinary Medicin** **DiyalaUniversity**

In view of the available recommendation, I forward this thesis for debate by the examining committee.

Signature:

Name: Dr. Najim Abdullah Al-Zubaidy

Assistant Prof.

Date: / /2012

Head of the Department of Biology/College of Education for Pure Science -

Diyala University

Certification

We are the members of the examining committee certify that after reading this thesis **(A Comparative Study on Three Methods for Detection of Rotavirus from Patients with Diarrhea and Animals)** and examining the student **(Ansam Dawood Salman)** in its contents. We think it is adequate with standing (Excellent) for the master degree in Biology / Microbiology.

Signature Chairman:

Professor

Name: Dr. Abas Aboud Farhan

Date: / /2012

Signature:

Professor

Name: Dr. Hamed Majeed Jasem

Member

Date: / /2012

Signature:

Assist Professor

Name: Dr. Mohamed Khalepha Khdear

Member

Date: / /2012

Signature:

Professor

Name: Dr. Adnan Namma Abdul-Ridha

Member and Supervisor

Date: / /2012

Signature:

Assist Professor

Name: Abdul- Razak Shafiq Hasan

Member and Co-advisor

Date: / /2012

Signature:

Dean of the College

Name:Professor Dr. Abas Aboud Farhan

Date: / /2012

Dedication

To....

The light of my life... My mother and My father

To....

My Dear... My brothers and sisters

To....

That who make Difficulties easy... My Husband

To....

My eyes... My son Ayhum

Acknowledgements

I wish to express my deep gratitude to my co advisor Assit. Professor Dr. Abdul-Razak Shafiq Hasan for suggesting the subject and his scientific guidance throughout the study. I also wish to express my deep thanks to Professor Dr. Abas Aboud Farhan for his help and support.

I would like to thank super visor Professor Dr. Adnan Nama for his support, also I would like express my thanks and gratitude to Dr. Kreem Saudon for his help and technical support.

I offer a personal expression of gratitude to my family and my friends for their help and support.

My appreciation is due to all the staff members of Laboratory attending Al-Batool Maternity and Children Teaching Hospital and all staff members of the Puplic Health Laboratory in Baquba for their kind help in collecting specimens.

I would like to thank Miss. Alya Monther for her assistance in collecting specimens.

Finally, I wish to express my sincere thanks twice to which I forget.

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة للمدة من 2010/8/1 ولغاية 2011/8/30 في مدينة بعقوبة. هدفت الدراسة الى التحري عن القدرات التشخيصية للتقنيات المختبرية المختلفة و هي :تقنية التلازن المباشر, تقنية الاليزا و تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل على الكشف عن الفيروس العجلي في نماذج البراز المأخوذة من الإنسان و بعض انواع الحيوانات الداجنة, و كذلك التحري عن تأثير بعض العوامل الديموغرافية على نسب الكشف بواسطة هذه التقنيات المختبرية.

شملت هذه الدراسة 120 مريضا ممن يعانون من الإسهال الحاد 70 من الذكور و 50 من الإناث تتراوح أعمارهم بين شهرين إلى خمس سنوات. جمعت معلومات ديموغرافية عن المرضى من قبل ذويهم فيما يتعلق بـ العمر, الجنس, محل السكن, نوع التغذية و مصدر مياه الشرب. فضلا عن ذلك شملت الدراسة 60 من الحيوانات الداجنة السليمة ظاهريا.

جمعت عينات البراز من كل المرضى و الحيوانات الداجنة. اجري الكشف عن الفيروس العجلي في نماذج البراز بواسطة اختبار التلازن المباشر, اختبار الاليزا و اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل. اختبار الاليزا اجري في وحدة الفيروسات / مختبر الصحة المركزي في بعقوبة, بينما اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل اجري في مختبر الفيروسات / كلية الطب البيطري / جامعة ديالى.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ارتفاعا في نسب الإصابة الكلية بالفيروس العجلي بين المرضى المصابين بالإسهال الحاد و باستخدام اختبار التلازن المباشر, اختبار الاليزا و اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل حيث كانت 70%, 93.33% و 93.88% على التوالي. سجلت نسب إصابة عالية بين أولئك المرضى ممن تتراوح أعمارهم 15≤-10< اشهر وبوساطة الاختبارات

التشخيصية الثلاث. لم تظهر التقنيات الثلاث اختلافا معنويا في نسب الإصابة بين الإناث و الذكور حيث كانت (72% و 68.57%)بوساطة اختبار التلان المباشر, (96% و 91.42%) بوساطة اختبار الاليزا و (88% و 96.86%) بوساطة اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل. كذلك الحال كان هناك اختلافا غير معنويا في نسب الإصابة بين المرضى الذين يقطنون المناطق الحضرية و الريفية, (70.31% , 69.64%)بوساطة اختبار التلان المباشر, (95.31%, 97.07%) بوساطة اختبار الاليزا و (95.65%, 92.30%) بوساطة اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل.

أظهرت النتائج ارتفاعاً غير معنوي في نسب الإصابة بين المرضى ممن هم دون السنتين من العمر و الذين يتغذون على الرضاعة المختلطة اذ كانت (80.55%, 97.22%, 91.66%)على التوالي و الرضاعة الصناعية اذ كانت (69.49%, 94.91% و 100%) على التوالي مقارنة بأولئك الذين يتغذون على الرضاعة الطبيعية إذ كانت (73.33 %, 86.66% و 77.77%) على التوالي و بوساطة الاختبارات الثلاثة (اختبار التلازن المباشر, اختبار الاليزا و اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل).

كانت نسب الإصابة بالفيروس العجلي مرتفعة بشكل غير معنوي بين المرضى الذين يستخدمون مياه الإسالة كمصدر لمياه الشرب اذ كانت (80.95%, 94.68% و 97.22%)على التوالي مقارنة بأولئك الذين يستخدمون المياه المعبأة اذ كانت (72.22%, 88.46 و 84.61%)على التوالي و بوساطة الاختبارات الثلاثة (اختبار التلازن المباشر, اختبار الاليزا و اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل).

كانت الخصوصية و النوعية لكل من اختبار التلازن المباشر و اختبار الاليزا مقارنة باختبار تفاعل البلمرة المتسلسل في الكشف عن الفيروس العجلي في نماذج براز الإنسان (75.56%, 66.67%) بالنسبة لاختبار التلان المباشر, بينما (91.3% و 66.67%)لاختبار الاليزا.

أظهرت نتائج اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل إن نسب الكشف عن الفيروس العجلي في نماذج براز الحيوانات الداجنة السليمة ظاهريا كانت 76.92%.

تستنتج الدراسة إن نسب الكشف عن الفيروس العجلي كانت عالية بين الأطفال الذين تتراوح أعمارهم دون الخامسة و يعانون من الإسهال الحاد وخاصة في الأطفال الذين هم دون السنتين من العمر في مدينة بعقوبة. علاوة على ذلك, إن نسب الكشف بوساطة اختبار الاليزا كانت متقاربة مع تلك التي كانت بوساطة اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي مما يوحي أن اختبار الاليزا هو الطريقة الأنسب مع حساسية و خصوصية ممتازة للكشف عن الفيروس العجلي في نماذج البراز في مدينة بعقوبة. بالإضافة إلى ذلك, بينت الدراسة ان حيوانات المزارع الداجنة بشكل ملحوظ يمكن أن تكون مصدرا للعدوى بالفيروس العجلي في المجتمع.

1. Introduction

Introduction:

Today, Rotaviruses are recognized as the single most significant cause of severe gastroenteritis, malnutrition and diarrhea in young children in both developed and developing countries worldwide (Bishop, 2009). Although RV can infect older children and adults, diarrheal disease is primarily observed in children under 2 years of age (Bernstein, 2009). It accounts for 5% of all deaths in children younger than 5 years in developing countries. Mortality rates in developed countries on the other hand are very low and illness is usually self limiting (Black *et al*., 2010; Frieden *et al*., 2011).

The RV belongs to the *Reoviridae* family, exhibits icosahedral symmetry, it is not enveloped and was first identified by electron microscopy by Bishop *et al.*(1973). The viral particle consists of three layers of protein and the viral genome consists of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA), which encode six structural proteins, VP1-4, VP6 and VP7 and six non-structural proteins, NSP1-6 (Pesavento *et al*., 2006). The VP6 protein, located in the inner capsid of the virus contains the antigenic determinants, which allow their classification into seven serogroups of A to G, with group A being the most common agent of childhood diarrhea (Parashar *et al*., 2006). At present, 5 rotavirus serotypes (G1, G2, G3, G4, G9) are the predominant circulating strains, accounting for approximately 95% of strains worldwide, although there is considerable geographic variability (Santos and Hoshino, 2005; O'Ryan, 2009).

RVs are transmitted by fecal-oral spread, and possibly also by the respiratory route (Kapikian *et al*., 2001). It has an incubation period of 18-36 hours. Following ingestion, the virus attaches to and then replicates in the differentiated villous columnar epithelial cells (enterocytes) lining the upper small intestine. Death and desquamation of infected enterocytes impairs the normal digestive and absorptive processes, outcomes a watery diarrhea of 2-7 days duration, resulting in loss of fluids and electrolytes, which may lead to

severe or fatal dehydration. Rotavirus induced diarrhea is thought to be caused by a combination of factors (Lorrot and Vasseur, 2007), which include a reduction in epithelial surface area, replacement of mature enterocytes by immature cells, an osmotic effect resulting from incomplete absorption of carbohydrates from the intestinal lumen with bacterial fermentation of these non-absorbed compounds, secretion of intestinal fluid and electrolytes through activation of the enteric nervous system (Lundgren and Svensson, 2001; Ruiz *et al*., 2009), and the effect of the RV non-structural protein 4 (NSP4), which is thought to act as a viral enterotoxin (Borghan *et al*., 2007).

Rotaviruses are generally species-specific, but cross-species transmission is possible, causing economically significant malady in neonates of many domestic animals (Cook *et al*., 2004; Dhama *et al*., 2009). There is increasing evidence that animal rotaviruses can infect humans, either by direct transmission of the virus or by contributing one or several genes to reassortmants with essentially a human strain genetic background, as mixed infections are prerequisite for reassortment events (Gentsch *et al*., 2005; Muller and Johne, 2007). Therefore, animal rotaviruses are regarded as a potential reservoir for genetic exchange with human rotaviruses (Martella *et al*., 2010).

Initially, diagnosis of rotavirus infection was performed using electron microscopy, by visualization and observation of the rotavirus wheel-like appearance (Arcangeletti *et al*., 2005). Nowadays, the laboratory diagnosis of rotavirus infection is usually performed by antigen detection, using latex agglutination techniques, which is affirmed to be a good tool for the simple and rapid detection of RV in stool specimens (Kohno *et al*., 2000; Pirkooh and Shahrabadi, 2007). Enzyme-linked immunosorbant assays which are the most preferably used due to their high sensitivity and specificity for detection of RV in different pathological specimens (Ghazi *et al*., 2005;Ferreira *et al*., 2006; Vainio *et al*., 2009). More sensitive and newer methods are molecular techniques such as polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and reverse

transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), which are used to determine the RV-RNA migration patterns and virus genotyping, respectively (Buesa *et al*., 1996).

RV-induced diarrhea now is considered to be a disease that can be prevented through vaccination (Vesikari, 2009). Two live attenuated oral rotavirus vaccines were licensed in 2006: Rotarix (GlaxoSmithKline), a human rotavirus vaccine with G1P[8] serotype characteristics, and RotaTeq (Merck), a bovine-human reassortant vaccine expressing human G1-4 and P[8] antigens. Rotarix is an oral live-attenuated human RV vaccine containing a single G1P[8] strain. It afforded sustained high protection against severe RV gastroenteritis during the first 2 years of life in a region with a changing pattern of wild-type RV circulation (O'Ryan and Linhares, 2009). RotaTeq is a three-dose, orally administered, live, pentavalent human-bovine reassortant RV vaccine used for the active immunization of infants for prevention of RV gastroenteritis (Plosker, 2010). With the introduction of these two vaccines in many countries, it appears that the total number of hospitalizations due to RV infections is being reduced, at least in developed countries that implemented a universal immunization program (Greenberg and Estes, 2009).

.

Aims of the study

The present study was conducted to achieve the following aims.

1. The diagnostic capability of different laboratory techniques namely; rapid latex agglutination test, enzyme-linked immunosorbant assay, and polymerase chain reaction for the detection of RV in stool specimens of human and certain domestic animal species.

2. The effects of certain demographic factors on the detection rate by these laboratory techniques.

4. Results and Discussion

4.1. Results

Results presented below are based on statistical analyses of the data accumulated throughout the study period.

4.1.1. Study groups

4.1.1.1. Human patients

One hundred and twenty patients with acute diarrhea were included in this group. The mean age of patients was 11.01 ± 9.71 months. The age range was 2 months to 5 years. 70 (58.33%) of patients were males and 50 (41.67%) were females. 64 (53.33%) of patients were from urban areas, while 56 (46.67%) were reside in rural areas. Regarding the source of drinking water, the results revealed that 94 (78.33%) utilize municipal water and 26 (21.67%) consume bottled water. Patients below 2 years of age constitute 110 (91.66%). The type of feeding among those patients was categorized as breast feeding (13.6%), bottle feeding (53.6%) and mixed feeding (32.7%), table (4.1), figures (4.1), (4.2), (4.3), (4.4), and (4.5).

Table (4.1): Descriptive table for variables in human patients (n=120)

Variable	Frequency	%
Age (months)		
≤5 months	26	21.66
>5months & ≤10months	57	47.5
>10months & ≤15months	18	15
>15months & ≤20months	10	8.33
>20months	9	7.5
Sex		
Male	70	58.33
Female	50	41.67
Residence		
Urban	64	53.33
Rural	56	46.67
Type of feeding(n=110)		
Breast	15	13.6
Bottle	59	53.6
Mixed	36	32.7
Source of water		
Municipal water	94	78.33
Bottled water	26	21.67

4.1.1.2. Animal group

This group include 60 healthy animals, the animal species were as follow; 25 cows, 25 sheep and 10 goats.

4.1.2. Detection of rotavirus in human

4.1.2.1. Direct agglutination test

Results in table (4.2) revealed that RV was detected in 84 (70%) of patient stool specimens, while 36(30%) of the specimens were negative.

Table (4.2): Results of DAT test for human stool specimens

Result		Frequency	%
Human n=120	Positive	84	70.0
	Negative	36	30.0

4.1.2.2. Enzyme-linked immunosorbant assay

Using the ELISA technique for detection of RV in stool specimens, the results showed that 112(93.33%) of the specimens were positive, and only 8 (6.67%) were negative, table (4.3).

Table (4.3): Results of ELISA technique for human stool specimens

Results		Frequency	%
Human n=120	Positive	112	93.33
	Negative	8	6.67

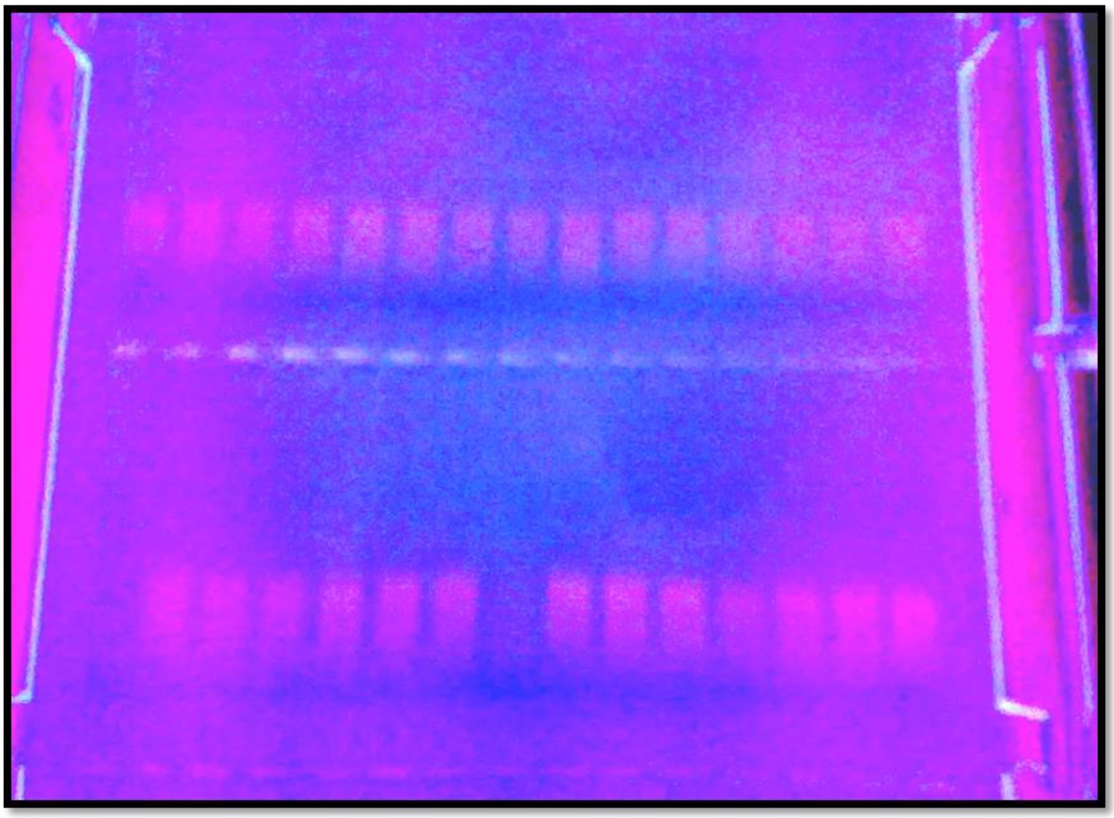
4.1.2.3. Polymerase chain reaction

Table (4.4) demonstrated that RV-RNA was detected in 46 out of 49 (93.88%) of the stool specimens by RT-PCR technique, while only 3(6.12%) specimens were negative.

Table (4.4): Results of RT-PCR technique for human stool specimens

Results		Frequency	%
Human n=49	Positive	46	93.88
	Negative	3	6.12

1 2 3 4 5 6 7 8 **C+** 9 10 11 12 13 14



15 16 17 18 19 20 **C-** 21 22 23 24 25 26 27

Figures (4.1): Results of gel electrophoreses for human stool specimens

4.1.2.4. Sensitivity and specificity

The sensitivity and specificity of DAT and ELISA in detecting RV in human stool specimens were shown in table (4.5). The sensitivity, specificity, positive predictive and negative predictive values of DAT was 75.56%, 66.67%, 97.22% and 15.39% respectively. Whereas, the sensitivity, specificity, positive

predictive and negative predictive values of ELISA was 91.3%, 66.67%, 97.67% and 33.33% respectively.

Table (4.5): Sensitivity and specificity of DAT test and ELISA test in detection rotavirus in human patients

Detection Methods	Sensitivity	Specificity	+ve predictability	-ve predictability
DAT	75.56%	66.67%	97.22%	15.39%
ELISA	91.3%	66.67%	97.67%	33.33%

4.1.2.5. Detection rate by different techniques

Table (4.6) showed a comparison in the detection rate of the 49 stool specimens tested by the three different techniques. The positivity rate of DAT, ELISA, and RT-PCR were 73.5%, 87.8%, and 93.9% respectively. The detection rate of RT-PCR was found to be significantly higher (p=0.01) as compared to other two techniques.

Table (4.6): Rotavirus detection rate by the three techniques

Tests	No. positive (%)	No. negative (%)	P value
DAT	36(73.5)	13(26.5)	0.015
ELISA	43(87.8)	6 (12.2)	
RT-PCR	46(93.9)	3(6.1)	

4.1.3. Effects of certain factors on DAT results

Although the positivity rate of DAT was found to be highest among the age group > 10 months to ≤ 15 months (77.77%) compared to other age groups; however, the difference in the positivity rate among the age groups was failed to reach the levels of statistical insignificance (p = 0.059), table (4.7).

Table (4.7): Distribution of DAT results according to age

Age (months)	Result of DAT			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
≤5 months	20(76.92)	6(23.07)	26	0.059 [NS]
>5months - ≤10months	42(73.68)	15(26.31)	57	
>10months - ≤15months	14(77.77)	4(22.22)	18	
>15months - ≤20months	5(50)	5(50)	10	
>20months	3(33.33)	6 (66.66)	9	
Total	84	36	120	

NS: insignificant

Regarding gender, the DAT positivity rate was in females (72%) was insignificantly higher than that in males (68.57%), table (4.8).

Table (4.8): Distribution of DAT results according to sex

Sex	Result of DAT			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
Male	48(68.57)	22(31.42)	70	0.686 [NS]
female	36(72)	14(28)	50	
Total	84	36	120	

NS: insignificant

The results also showed that the DAT positivity rate among patients reside in urban areas was insignificantly higher (p=0.936) as compared to those from rural areas (70.31%, 69.64%), table (4.9).

Table (4.9): Distribution of DAT results according to residence

Residence	Result of DAT			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
Urban	45(70.31)	19(29.68)	64	0.936 [NS]
Rural	39(69.64)	17(30.35)	56	
Total	84	36	120	

NS: insignificant

According to the type of feeding among patients less than 2 years of age, the difference in the DAT positivity rate was insignificant (p=0.494) among those with breast (73.33%), bottle (69.49%), and mixed (80.55%) types of feeding, table (4.10).

Table (4.10): Distribution of DAT results according to type of feeding (n=110)

Type of feeding	Result of DAT			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
Breast	11(73.33)	4(26.66)	15	0.494 [NS]
Bottled	41(69.49)	18(30.50)	59	
Mixed	29(80.55)	7(19.44)	36	
Total	81	29	110	

NS: insignificant

Table (4.11) revealed that the DAT positivity rate among patients consume municipal water as a source of drinking water (80.95%) which was insignificantly higher (p= 0.288) than that in those patients consume bottled water (72.22%).

Table (4.11): Distribution of DAT results according to source of drinking water

source of drinking water	Result of DAT			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
Municipal	68(80.95)	16(19.04)	84	0.288 [NS]
Bottled	26(72.22)	10(27.77)	36	
Total	94	26	120	

NS: insignificant

Table (4.12) revealed the Spearman's correlation between DAT results and different demographic factors. The age of patients was significantly correlated with DAT results (p= 0.046) with a correlation coefficient (0.183). Of note, the effect of age was statistically insignificant in paired comparison as previously shown in table (4.7).

Table (4.12): Spearman correlation between DAT test and different parameters in 120 human patients

Parameters	DAT test	
	r	p
Age	0.183	0.046
Sex	- 0.037	0.689
Residence	0.007	0.937
Type of feeding	- 0.087	0.368
Source of drinking water	0.097	0.291

r= correlation coefficient, p =probability (level of significance)

4.1.4. Effects of certain factors on ELISA results

Results in table (4.13) revealed that the detection rate of RV by ELISA technique was highest in the age group (>10 months - ≤15 months) as compared to other age groups. However, the difference was failed to reach the statistical significance (p= 0.259).

Table (4.13): Distribution of ELISA results according to age

Age (months)	Result of ELISA			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
≤5 months	25(96.15)	1(3.84)	26	0.259
>5 months - ≤10 months	53(92.98)	4(7.01)	57	
>10 months - ≤15 months	18(100.00)	0(0.00)	18	
>15 months - ≤20 months	9(90.00)	1(10.00)	10	
>20months	7(77.77)	2(22.22)	9	
Total	112	8	120	

Regarding the gender, the results showed that the detection rate of RV in female was (96.0%) compared to (91.4%) in male patients, with non-significant difference between both sexes (p= 0.323), table (4.14).

Table (4.14): Distribution of ELISA results according to sex

Sex	Result of ELISA			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
Male	64(91.42)	6(8.57)	70	0.323
female	48(96.00)	2(4.00)	50	
Total	112	8	120	

Table (4.15) showed that the detection rate of RV was higher among patients reside in urban areas (95.3%) compared to those reside in rural areas (91.0%). The statistical difference between the two groups was insignificant (p= 0.353).

Table (4.15): Distribution of ELISA results according to residence

Residence	Result of ELISA			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
Urban	61(95.31)	3(4.68)	64	0.353
Rural	51(91.07)	5(8.92)	56	
Total	112	8	120	

The effect of type of feeding in patients less than 2 years of age was shown in table (4.16). It is clearly obvious that the highest detection rate of RV was among those with mixed feeding (breast plus bottle feeding), followed by those on bottle feeding, and the lowest rate was among those on breast feeding. However, the difference among these groups was statistically insignificant (p= 0.314).

Table (4.16): Distribution of ELISA results according to type of feeding (n=110)

Type of feeding	Result of ELISA			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
Breast	13(86.66)	2(13.33)	15	0.314
Bottled	56(94.91)	3(5.08)	59	
Mixed	35(97.22)	1(2.77)	36	
Total	104	6	110	

Although it is non-significant (p= 0.261), the results in table (4.17) revealed that the RV detection rate was lower among those patients consume bottled water (88.4%) compared to those consume municipal water (94.6%).

Table (4.17): Distribution of ELISA results according to source of drinking water

source of drinking water	Result of ELISA			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
Municipal	89(94.68)	5(5.31)	94	0.261
Bottled	23(88.46)	3(11.53)	26	
Total	112	8	120	

Table (4.18) revealed the Spearman's correlation between ELISA results and different demographic factors. The ELISA results showed no correlation with any of these demographic factors.

Table (4.18): Spearman correlation between ELISA test and different parameters in 120 human patients

Parameters	ELISA test	
	r	p
Age	0.091	0.325
Sex	- 0.09	0.326
Residence	0.085	0.357
Type of feeding	- 0.126	0.191
Source of drinking water	0.103	0.264

r= correlation coefficient, p =probability (level of significance)

4.1.5. Effects of certain factors on RT-PCR results

Results in table (4.19) showed that the RV-RNA detection rate was (100%) in three age groups; namely, >10 months - ≤15 months, >15 months -≤20 months, and >20months. Whereas, the lowest detection rate was among those ≤5 months (87.5%). Nevertheless, the difference among the age groups was statistically insignificant (p= 0.833).

Table (4.19): Distribution of RT-PCR results according to age

Age (months)	Result of RT-PCR			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
≤5 months	7(87.5)	1(12.5)	8	0.833
>5 months - ≤10 months	26(92.85)	2(7.14)	28	
>10 months - ≤15 months	6(100)	0(0.00)	6	
>15 months -≤20 months	4(100)	0(0.00)	4	
>20 months	3(100)	0(0.00)	3	
Total	46	3	49	

The RV-RNA detection rate among female patients was lower (88.2%) as compared to that in male patients (96.8%). The difference between the two groups was statistically insignificant (p= 0.23), table (4.20).

Table (4.20): Distribution of RT-PCR results according to sex

Sex	Result of RT-PCR			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
Male	31(96.87)	1(3.12)	32	0.23
female	15(88.23)	2(11.76)	17	
Total	46	3	49	

Regarding the effect of residence, The RV-RNA detection rate among urbaneness and ruralees were 95.6% and 92.3% respectively. The difference between the two groups was statistically insignificant (p= 0.626), table (4.21).

Table (4.21): Distribution of RT-PCR results according to residence

Residence	Result of RT-PCR			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
Urban	22(95.65)	1(4.34)	23	0.626
Rural	24(92.30)	2(7.69)	26	
Total	46	3	49	

Table (4.22) revealed that the RV-RNA detection rate was (100%) in those with bottled feeding compared to (91.66%) in those on mixed feeding and 77.77% in those with breast feeding. The difference between the groups was statistically insignificant (p=0.141).

Table (4.22): Distribution of RT-PCR results according to type of feeding n=110

Type of feeding	Result of RT-PCR			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
Breast	7(77.77)	2(22.22	9	0.141
Bottled	24(100.00)	0(0.00)	24	
Mixed	11(91.66)	1(8.33)	12	
Total	42	3	45	

The RV-RNA detection rate among those consume municipal water as a source of drinking water was (97.22%), while in those consume bottled water was (84.61%), with no statistical difference between the two groups (p= 0.283), table (4.23).

Table (4.23): Distribution of RT-PCR results according to source of drinking water

source of drinking water	Result of RT-PCR			P Value
	No. positive (%)	No. negative (%)	Total	
Municipal	35(97.22)	1(2.77)	36	0.283
Bottled	11(84.61)	2(15.38)	13	
Total	46	3	49	

Table (4.24) revealed the Spearman's correlation between PCR results and different demographic factors. No significant correlation was found between RT-PCR results with any of the demographic factors.

Table (4.24): Spearman correlation between RT-PCR test and different parameters in 49 human patients

Parameters	PCR test	
	r	p
Age	- 0.047	0.747
Sex	- 0.018	0.902
Residence	0.272	0.059
Type of feeding	0.064	0.688
Source of drinking water	0.082	0.576

r= correlation coefficient, p =probability (level of significance)

4.1.6. Results of different techniques in animal specimens

Table (4.25) showed the results of DAT, ELISA, and RT-PCR techniques in animal stool specimens. None of the 60 stool specimens were positive by DAT technique. In ELISA technique 1(1.67%) of stool specimens was positive for RV antigen. On the other hand, the RV-RNA was detected in 20 (76.92%) of the stool specimens by PCR techniques.

Table (4.25): Result of DAT,ELISA and RT-PCR test for animal specimens (n=60)

Type of test	No. positive (%)	No. negative (%)
DAT	0 (0.0)	60 (100.0)
ELISA	1 (1.67)	59 (98.33)
PCR	20 (76.92)	6 (23.08)

4.2 Discussion

4.2.1. Detection of rotavirus in human

4.2.1.1. Direct agglutination test

The overall RV infection rate among patients with acute diarrhea less than 5 years of age in Diyala province as detected by DAT in the present study was 70%.

The present results were inconsistent with other Iraqi researchers (Younis, 1989; Al-Falahi, 2002; Hasan *et al.*,2011b) who reported an infection rate of 26.3%, 24.4% and 20.3%, respectively among children less than 5 years using DAT technique. However, other workers (Abas, 1988; Al-Wardi, 1990) reported an infection rate 40% and 32.6% respectively. Nevertheless, worldwide studies have yielded variable RV infection rates among children less than 5 years old; for instance, in Korea (Koh *et al.*, 2008) reported an infection rate of 41.3%, while in Thailand (Intusoma *et al.*, 2008) reported an infection rate of 41.3%, and in Saudi Arabia, the infection rate was 30% (Kheyami *et al.*, 2006). These controversies in the results of the different studies maybe attributed to many reasons, the difference in geographical area, seasonal variation, sample size of the study, and the concentration of RV antigen in the collected specimens.

However, the present study suggest that the latex agglutination test for detection of RV antigen in stool specimens is a good tool for the simple and rapid screening test in a limited resources settings.

4.2.1.2. Enzyme-linked immunosorbent assay

In the present study, RV was detected in 93.33% of stool specimens by ELISA technique. Since, worldwide studies had reported variable results, so the present results were in agreement with some of these studies, like that conducted in Mecca-Saudi Arabia which reported an infection rate 95.8% among infants and young children with acute diarrhea (Chazi *et al*., 2005). However, it was higher than that reported by other studies; for instance, in Al-Karak Jordan, RV was detected in 39.9% of stool specimens of children below 5 years of age (Nafi, 2010). In Norway, an infection rate of 63% was reported among children with acute diarrhea (Vainio *et al*., 2009). Whereas, in European children younger than 5 years of age, the infection rate was 43.3 %(Forster *et al*., 2009). The disparity in the results of the different studies maybe attributed to the viral stool load, the sensitivity and specificity of ELISA technique employed, and the technical conditions.

4.2.1.3. Polymerase chain reaction

In the present study, 93.8% of patients with acute diarrhea were positive for RV antigen detected by conventional RT-PCR. These results were in agreement with that reported by other worker (Jinda *et al*., 2010). However, other worker reported a slightly lower infection rate 80.6% among children < 5 years of age using RT-PCR technique (Chitamber *et al*., 2008). Nevertheless, many studies have yielded variable results reported an infection rate of 52.7%, 58% respectively among children less than 5 years of age using RT-PCR (Koroglu *et al*., 2011; Wible *et al*., 1991). The variation in the results of the different studies maybe due to RNA extraction method, the sensitivity and specificity of the PCR technique for detection of particular antigen, and technical conditions and performance.

4.2.1.4. Sensitivity and specificity

The present study revealed that the sensitivity and specificity of DAT test compared to RT-PCR 75.56%, 66.67% respectively. These results were consistent with other researcher reported sensitivity and specificity for latex agglutination test 82.6%, 81.6% respectively (Pereira *et al*., 2011). However, other worker reported

higher result, the sensitivity and specificity were 98.2%, 94% respectively (Kohno *et al*., 2000).

The present results were agreement with results of other worker that the DAT technique is a good tool for the simple and rapid detection of RV in stool specimens (Kohno *et al*., 2000; Al-Yousif *et al*., 2001; Pirkooh and Shahrabadi, 2007). Other importance result was reported in this study, the sensitivity and specificity of ELISA test compared to RT-PCR 91.3%, 66.67% respectively. The present results were in agreement with results of other worker that the ELISA technique a highly beneficial sensitive and accurate for detection of RV in stool as well as other pathological specimens (Fischer and Gentsch, 2004; Chazi *et al*., 2005; Vaino *et al*., 2009).

4.2.1.5. Detection rate by different techniques

The present study revealed that the DAT and ELISA tests were highly significant difference when they compared to RT-PCR test in detection of RV in stool specimens.

Other researcher also reported differences among diagnostic techniques for detection of RV in stool specimens, (Vainio *et al*., 2009) used ELISA, DAT, and RT-PCR techniques for detection of RV in stool specimens, the detection rate was 63%, 58%, and 72% respectively. Additionally, (Wible *et al*., 1991) reported an infection rate by RV of 96 stool specimens for children < 5 years of age with acute diarrhea 36% by ELISA test, while 58% by RT-PCR test.

The disparity among results of three tests (DAT, ELISA, and conventional RT-PCR) may be due to many reasons, imported, Volume of specimen collected that the lower virus concentration may be leading to classification of such as cases as negative. Additionally, the sensitivity and specificity for three techniques, and technical conditions.

The present results indicate the importance of using ELISA and RT-PCR technique for detection of RV in stool specimens, and this agreement with other studies (Buesa *et al*., 1996; Husain *et al*., 2010) because of the RT-PCR is generally considered the gold standard tool in detection of RV and ELISA was found to be as effective as RT-PCR, additionally, it was a highly sensitive and accurate for detection of RV in stool specimens(Jarasvech *et al*., 1993; Xiaoli *et al*., 2004; Logan *et al*., 2006).

4.2.2. Effects of certain factors on DAT, ELISA, and RT-PCR results

4.2.2.1. Age

The results of present study revealed insignificant infection rate by RV among age group > 10months-≤ 15months (77.77%) detected by DAT test. These results were in agreement with those reported by other Iraqi researchers (Abas, 1988; Younis, 1989; Al-Falahi, 2002; Al-Kuheli, 2004; Hasan *et al*., 2011b). Additionally, worldwide studies reported results agreement with present results in the infection rate by RV increased among children less than 5 years of age and that children < 2 years were mostly infected (Phan *et al*., 2005; Gonzales *et al*., 2008; Schael *et al*., 2009; Atchison *et al*., 2009).

Another results in this study revealed that the detection rate of RV by ELISA test was insignificant highest in the age group> 10months-≤ 15months (100%). The present results were consistent with other workers (Chazi *et al*., 2005) reported an infection rate of 95.8% among infants and younger children using ELISA test. (Junaid *et al*., 2011) reported 90.9% an infection rate by RVin children 7-12 months of age, while in NewZealand, the infection rate was significantly higher in the age 12-25 months 52.1% (Grimwood *et al*., 2006). furthermore, worldwide studies reported an infection rate by RV using ELISA test for detected among children <5 years of age (Fischer *et al*., 2002; Kheyami *et al*., 2008; Malek *et al*., 2010; Nafi, 2010).

The rate of RV-RNA detection by RT-PCR test was (100%) in ages > 10 months-> 20 months. The present results were consistent with results of other workers who reported an infection by RV of 98%, 94.6%, and 96% respectively among children less than 22 months of age using RT-PCR test (Xiaoli *et al*., 2004; Chitamber *et al*., 2008; Koroglu *et al*., 2011).

The currnt study found that RV is the most causative agent of diarrhea in children under five years of age and the most effected age group was those under two years. Probably the most common sources of infection by RV were the persistence of RV infection in certain newborn nurseries and the high frequency of nosocomial RV infection in hospital, as well as waterborne epidemics, as RVs are resistance to chlorination (Ashbolt, 2004; Chandran *et al.*, 2006). Among factors that may contributes in the transmission of RV among these ages are the low health awareness and neglected personal hygiene, contamination of food and water for and contamination of children toys (Ahmed *et al*., 2004).

4.2.2.2. Gender

The absence of significant difference by three tests in the infection rate regarding the patients gender was also reported by other workers (Al-Falahi *et al*.,2002; Al-Kuheli, 2004; Carraro *et al*.,2008; Hassan *et al*., 2011b) suggesting the exposure of both sexes to equal risk for infection in our community (Brooks *et al*., 2007).

4.2.2.3. Residence

The significant difference by three tests in the infection rate among urban and rural patients in the present study was also reported by other studies (Al-Kuheli, 2004; Kheyami *et al*., 2006). However, another study reported significantly higher infection rate among patients reside rural area (Hassan *et al*., 2011b). It has been documented that the infection by RV increases between populations with low standard of living with low health education and shortage in health services, as the mortality rate among children in poor countries where RV account for 82% of the total deaths in the world. Malnutrition and limited access to the vaccine may play a role (Bartlett *et al*., 1996). Additionally, several studies have documented that the domestic farm animals and birds may play a role in disseminating the RV; therefore indoor breeding of such animals in both communities increases the risk of RV transmission to humans (Martella *et al*., 2010).

4.2.2.4. Type of feeding

The current results with respect to rates of infection with RV and how it relates to the type of feeding and using the diagnostic methods of the three (DAT, ELISA, and RT-PCR) although it is not significant statistically it shows a rise in infection rates among children feed on breast-mixed industrial compared with the breastfeeding, and these results were consistent with other studies (Gupte, 1996; Al-Falahi, 2002; Hassan *et al*., 2011b).

Multiple studies had documented that the mother's milk contain factors of natural immunity (IgA and IgG) , and some factors of cellular immunity that play a role in the virus inhibitory (Asensi *et al*., 2006). Mother's milk also contains many other factors as glycoprotein and lactoferine which contribute in preventing or reducing the incidence of the RV (Newburg *et al*., 1998).

4.2.2.5. Source of drinking water

The present study revealed insignificant difference in the infection rate among patients consuming municipal water compared to other source of water supply by three tests used for detection (DAT, ELISA, and RT-PCR). The present results were consistent with almost all previous studies affirming the importance of contaminated water for transmitting the virus (Hamza *et al*., 2009; Hassan *et al*., 2011b). Of note, several studies have documented the detection of RV from municipal water and other water supply by molecular techniques (Van *et al*., 2006; Scarcella *et al*., 2009). It has been reported that RVs are resistant to chlorination. Additionally, standard sanitary measure that kill most bacteria and parasites are ineffective in controlling RV, therefore, the acute gastroenteritis may be arise due to consumption of contaminated municipal water (Chandran *et al*., 2006; Scarcella *et al*., 2009).

4.2.3. Spearman correlation between DAT, ELISA, and RT-PCR tests and different parameters

In the present study, the results of three tests (DAT, ELISA, and RT-PCR) revealed no correlation with different parameters included: age, sex, residence, type of feeding, and source of drinking water, except the age which showed significant correlation with DAT results and this results may be due to the efficiency of DAT test in the detection of RV in stool specimens.

RV is the most causative agent of diarrhea worldwide (Carraro *et al*., 2008). RV is transmitted by the mouth through the consumption of water and food contaminated with the virus, and contributes in many factors in the transmission of RV, especially in developing countries, as poor health education and neglected personal and public hygiene, and contaminated water and foods intended for human consumption (Ahmed *et al*. 2004). Of note, RV is responsible for more than 870 thousand new cases and deaths per year among children under five years of age in developing countries (Fischer *et al*., 2007).

4.2.4. Results of different techniques in animal specimens

The present study showed the results of DAT, ELISA, and RT-PCR techniques in animal stool specimens were 0.00%, 1.67%, and 76.92% respectively. Worldwide studies have yielded variable results depending on the geographical area, nature of samples and typing (diarrheic or non-diarrheic), and laboratory technique employed; for instance, (Kaminjolo and Adesiyun, 1994)

reported an infection rate of 29.4% among diarrheic or non-diarrheic calves and goats tested by latex agglutination test, while In Switzerland, (Uhde *et al*., 2008) reported an infection rate of 58% among untreated calves suffering from acute diarrhea using ELISA technique. In another study using ELISA test, RV was detected in 3.7% of the samples from non-diarrheic calves (Klingenberg and Svensson, 1998). In a study in Slovenia, to determine the incidence of asymptomatic RV infection in animal using RT-PCR (Steyer *et al*., 2008) reported the rate of asymptomatic shedding of RVs in cattle was 40%. The fluctuation in the detection rate of RV in animal feces may be multifactorial including; number and species of animals enrolled, the viral load in animal feces, and the laboratory technique employed.

Regardless the rate of detection, generally most of the previous studies had affirmed the liability of different animal species for infection by and shedding of RV, which may be an additional source for the dissemination of the virus in the community.

The presence of RV antigen in the feces of healthy animal at a rate of 76.92% suggest that these animal should be considered as carrier of RV which result in increasing evidence that animal RVs can infect humans, either by direct transmission of the virus or by contributing one or several genes to reassortmants with essentially a human strain gentic background, as mixed infections are a prerequisite for reassortment events (Gentgch *et al*., 2005; Muller and Johne, 2007).

3. Materials and methods

3.1. Materials:

3.1.1. Laboratory equipments and instruments:

The following Laboratory equipments and instruments were used during the study as showing in table (3.1).

Table (3.1): Equipments and instruments used in the study

Equipments and instruments	Company and country of origin
Centrifuge	Kokusan (Germany)
Eppendrof centrifuge	Eppendorf (=)
Incubator	Termaks (=)
Deepfreeze -20º C	Helmar (France)
Deepfreeze -37º C	Revco (=)
ELISA system	Biotek (USA)
PCR system (Thermocycler)	Eppendorf (Germany)
Gel electrophoresis apparatus	Optima (Japan)
U.V. transelumenter	Optima (=)
Power supply	Optima (=)
Camera	Sony (=)
Hotplate stirrer	Labinco (Germany)
Sensitive balance	Sartorius (=)
Water bath	Biosan (USA)
pH meter	Sartorius (Germany)
Autoclave	Biosan (USA)
Oven	Barnstead international (USA)
Timer	Termaks (Germany)
Automatic pipettes	Mmk (China)

3.1.2. Chemicals:

The following chemical materials were used throughout the study as showing in table (3.2).

Table (3.2): Chemical materials used in the study

Chemicals	Company and country of origin
Sodium chloride	Himedia Laboratories (India)
Potassium chloride	Himedia Laboratories (=)
Sodium phosphate	Himedia Laboratories (=)
Potassium phosphate	Himedia Laboratories (=)
Absolute ethanol	Himedia Laboratories (=)
Tris Hydrochloride	Himedia Laboratories (=)
Sodium acetate	Riedel – De Haen (Germany)
EDTA	Thomas baker (India)
Sodium hydroxide	Scharlau (Spain)
Agarose	Scharlau (=)
Ethidium bromide	Himedia Laboratories (India)
Hydrochloric acid	Himedia Laboratories (=)

3.1.3. Laboratory diagnostic kits:

The following laboratory kits were employed throughout the study as showing in table (3.3).

Table (3.3): Laboratory diagnostic kits used in the study

Item	Company and country of origin
Direct agglutination test kit	DiaSpot (USA)
Rotavirus Ag ELISA (stool) kit	DRG (Germany)
Rotavirus Ag PCR kit	Sacace (Italy)
RNA extraction kit	Bromega (USA)

3.2. Methods:

3.2.1. Preparation of solutions:

3.2.1.1. Sodium hydroxide (1%)solution:

This solution was prepared according to the method described by (Cetinkurt and Jurgen, 2005). 1gram of sodium hydroxide powder was dissolved in 100 milliliters of distilled water, mixed well, and the pH was adjusted to 14.

3.2.1.2. Hydrochloric acid (1%) solution:

This solution was prepared according to the method described by (Karpenko and Norris, 2001). 1 milliliter of concentrated hydrochloric acid was added to 99 milliliters of distilled water, mixed well, and the pH was adjusted to 1.

3.2.1.3. Phosphate buffer saline:

This solution was prepared according to method described by (Dulbecco *et al.*, 1974). 8 grams of sodium chloride, 0.2 grams of potassium chloride, 1.15grams of sodium phosphate and 0.2 grams of potassium phosphate were dissolved in 1000 milliliters of distilled water, mixed well, then sterilized by autoclave at 121^0C for 15 minutes and the pH was adjusted to 7.3 and then kept at 4^0C.

3.2.1.4. Running buffer (TBE-buffer):

This solution was prepared according to the method described by (Maniatis *et al*., 1982). 6.3grams of tris-hydrochloride, 0.41grams sodium acetate and 0.29 grams of EDTA were dissolved in 1000 milliliters of distilled water, mixed well, and the pH was adjusted to 7.8 and then kept at 4 ^{0}C.

3.2.1.5. Ethidium bromide solution:

This solution was prepared according to the method described by (Maniatis *et al*., 1982). 1.5 milligrams of ethidium bromide was dissolved in 7.5 milliliters of TBE-buffer, mixed well, and then kept at 4 ^{0}C.

3.2.1.6. Agarose gel:

This gel was prepared according to the method described by (Brody and kern, 2004). 3 grams of agarose was dissolved in 150 milliliters of TBE-buffer and hooted by hotplate starrier to 100 ^{0}C, 750 microliters of ethidium bromide solution was added to agarose hooted (to a final concentration of 1.5 milligrams/milliliter), mixed well, and then the agarose gel was cooled to 45-50 ^{0}C prior to use.

3.2.2. Study groups:

The present study was conducted in Baquba city for the period from 1/August/2010 to 30/August /2011. Two groups were included; the first group comprises 120 patients with acute diarrhea. The patients were attended Al-Batool Maternity and Children Teaching Hospital and the following Primary Health Care Centers in Baquba (Al-Takea, Al-Sarai

and Al-Tahrer). Seventy of patients were males and 50 were females. The age range was 2 months to 5 years. Special questionnaire was pre-constructed to collect information regarding age, sex, residence, type of feeding and source of drinking water. The information was collected through short personal interview with patient's parents. Appendix (1).

The second group consist of 60 healthy domesticated farm animals, the animal species and the number included were as follow; 25 cows, 25 sheep and 10 goats. Specimens were collected by the aid of veterinarians of Veterinary Hospital in Baquba.

3.2.3. Collection of stool specimens:

One hundred and twenty stool specimens were collected from patients were diagnosed by the doctor with disposable clean containers with tightly fixed caps. The specimens were transferred to the laboratory of Al-Batool Maternity and Children Teaching Hospital in a cool box as soon as possible. Direct detection of RV in stool specimens using direct agglutination test was performed as soon as possible after collection. The direct agglutination technique was carried out at Al-Batool Maternity and Children Teaching Hospital in Baquba. For ELISA test, about 1 gram of stool specimen was added to 4 mililiters of ELISA diluted washing buffer and the specimens kept frozen at -20 ^{0} C until used. The ELISA technique was carried out at the Virology Unit/ Public Health Laboratory in Baquba. For PCR technique, about 0.1 gram of stool specimen was added to 1 milliliter of normal saline solution in 1.5 milliliter polypropylene tubes, vortexed vigorously to get a homogenous suspension. The tubes were kept frozen at -37 ^{0} C until used. The PCR technique was carried out at Virology Laboratory/ College of Veterinary Medicine- Diyala University.

60 stool specimens were collected from healthy domesticated farm animals. The collection and processing of specimens were similar to that of human specimens.

3.2.4. Detection of rotavirus:

3.2.4.1. Direct agglutination test:

This test was performed using commercially available kit (Diaspot – USA Direct agglutination kit).

3.2.4.1.1. Test principle:

The test device is one step qualitative lateral flow immunoassay for the detection of RV in human feces specimen. The device membrane is pre-coated with anti-rotavirus antibody on the test line region. During testing, if the specimen contains RV, it will react with the coated anti-rotavirus antibody, and the mixture migrates upward on the membrane chromatographically by capillary action to generate a red colored line.

3.2.4.1.2. Test procedure:

1. The test was performed within 2 hours after collection following the manufacturer's instructions. The test device, specimens, and buffer were left for 15 minutes in room temperature prior to testing.
2. For solid stool approximately 50 mg were taken randomly by specimen collection applicator, and for liquid stool 2 drops (approximately 50 microliters) were taken. In each case, the specimen was transferred to specimens collection tube containing the dilution buffer and shacked vigorously to homogenize the mixture.
2. Two full drops of the extracted specimen (approximately 80 microliters) were transferred to the specimen well (S) of the test device and then started the timer.
3. The results were read at 10 minutes after dispensing the specimen.

3.2.4.1.3. Interpretation of results:

Positive results were indicated by the appearance of two distinct colored lines. One colored line represents the control red line region and the second colored red line represents the test line region. The Negative results were indicated by the appearance of one distinct colored line in the control region only.

3.2.4.2. Rotavirus Ag (stool) ELISA test:

This test was performed using commercially available kit (DRG-Germany Rotavirus Ag ELISA stool kit).

3.2.4.2.1. Test principle:

The Rotavirus Ag (stool) ELISA is an *in vitro* procedure for the qualitative determination of rotavirus antigen in feces. The solid phase of the microtiter plate was pre-coated with anti-rotavirus antibodies. Upon addition of the stool specimens, the rotavirus antigens present in the stool supernatant were captured by antibodies attached to the wells. During the second incubation, the anti-rotavirus antibody was added which sandwiched the RV antigens. Thereafter, the horseradish peroxidase was added that attached to the pre-formed sandwich. Then the wells were washed to remove unbounded enzyme, and the chromogen was added which develops a blue color in the presence of the enzyme complex. The reaction was stopped by addition of stopping solution which turned the blue color to yellow. The intensity of the color is directly proportionate to the concentration of rotavirus antigen in the stool specimen.

3.2.4.2.2. Test procedure:

1. One hundred microliters of each of negative control and positive control were added to assigned wells (used both as undiluted).
2. One hundred microliters of the stool supernatant was added to the appropriated test well (patient wells).

3. The plate was incubated at room temperature for 30 minutes, and then washed for 3 times with diluted washing buffer.

4. Two drops of anti-rotavirus antibodies were added to each well.

5. The plate was incubated at room temperature for 5 minutes, and then washed for 3 times with diluted washing buffer.

6. Two drops of anti-mouse antibodies conjugated to horseradish peroxidase were added to each well.

7. The plate was incubated at room temperature for 5 minutes, and then washed for 3 times with diluted washing buffer.

8. Two drops of Chromogen was added to each well.

9. The plate was incubated at room temperature for 5 minutes.

10. Two drops of Stop solution were added to each well. Mixed wells by tapping strip holder.

11. The optical density (OD) of wells was read using ELISA spectrophotometer reader at 450 nanometers wave length.

3.2.4.2.3. Interpretation of results:

Reactive results were indicated by the absorbance reading of 0.15 and above, while the non-reactive results were indicated by the absorbance reading less than 0.15.

3.2.4.3. Molecular detection of rotavirus:

3.2.4.3.1. RNA extraction:

3.2.4.3.1.1. Preparation of solution:

1. DNase I :

DNase I was prepared by dissolving the amount of the DNase I powder in 600 microliters of nuclease free water, capped tightly, and then stored at -20 ^{0}C for uses.

2. RNA lysis buffer:

RNA lysis buffer was prepared by adding 200 microliters of the β-mercaptoethanol (BME) to 10 milliliters of the RNA lysis buffer (RLA), capped tightly, and then stored at 4 ^{0}C for uses.

3. RNA washing solution:

RNA wash solution was prepared by adding 20 milliliters of the 95% ethanol to the bottle containing 11.8 milliliters concentrated RNA wash solution, capped tightly, and then stored at 22-25^{0}C for use.

4. DNase stoping solution:

DNase stop solution was prepared by adding 8 milliliters of the 95% ethanol to the bottle containing 5.3 milliliters concentrated DNase stopping solution, capped tightly, and then stored at 22-25º C for use.

3.2.4.3.1.2. RNA extraction procedure:

1. One hundred and seventy five microliters of the stool sample was transferred to each eppendorf tube by pipetting and added 175 microliters of the RNA lysis buffer to each sample, mixed by pipetting 3-4 times.
2. Three hundred and fifteen microliters of the RNA dilution buffer was added to each eppendorff tubes and mixed by pipetting 3-4 times. The mixture in each eppendorff tubes were placed in the water bath at 70º C for 3 minutes.
3. The mixture in each eppendorf tubes were transferred to the centrifuge and centrifugation at 13000 xg for 10 minutes at 25º C.
4. Two hundred microliters of the 95% ethanol were added to each eppendorf tube and mixed by pipetting 3-4 times.
5. The mixture in each eppendorf tubes were transferred to the spin column and placed the spin column into the spin basket (collection tube), centrifuged at 13000 xg for one minute.
6. The spin basket was tacked from the spin column assembly, and the liquid in the collection tube was discarded.
7. The spin basket was putted back into the collection tube.
8. Six hundred microliters of the RNA wash solution were added to the spin column assembly, centrifuged at 13000xg for 1 minute.
9. The collection tube was emptied.

10. For each sample was freshly prepared the DNase incubation mix by combining 40 microliters of the yellow core buffer, 5 microliters of the 0.09 $MnCl_2$ and 5 microliters of the DNase I enzyme in sterile tube. Mixed by pipetting. 50 microliters of this freshly prepared (DNase incubation mix) was added directly to the membrane inside the spin basket.

11. The spin basket was incubated for 15 minutes at 25º C. After the incubation, 200 microliters of the DNase stopping solution were added to the spin basket and centrifuged at 13000xg for 1minute.

12. The collection tube was emptied.

13. Six hundred microliters of the RNA wash solution were added and centrifuged at 13000xg for 1 minute.

14. The collection tube was emptied, and 250 microliters of the RNA wash solution was added and centrifuged at 14000xg for 2 minutes.

15. For each sample, the 1.5 milliliters elution tube cap was removed. The spin basket was transferred from the collection tube to elution tube, one hundred microliters of the Nuclease-Free water was added to the membrane.

16. The spin basket assemblies were placed in the centrifuge with the lids of the elution tubes facing out.

17. The spin basket was removed and discarded. The elution tube was capped containing the purified RNA and stored at -20º C.

3.2.4.3.2. RT-PCR test:

This test was performed using commercially available kit (Sacace Biotechnologies / Rotavirus 280 PCR kit).

3.2.4.3.2.1. Test principle:

The test principle of the kit rotavirus 280 was based on four major processes: isolation of rotavirus RNA from specimens, reverse transcription of the RNA, amplification of the cDNA and detection of the amplified products on agarose gel.

3.2.4.3.2.2. Test procedure:

Reverse Transcription:

1. The reaction mix was prepared: for 12 reactions, five microliters of the RT-mix-1 was added into the tube containing RT mix and vortex for 9 seconds, centrifuged briefly. Six microliters of the M-MLV was added into the tube with reagent mix, mixed by pipetting, vortex for 3 seconds and centrifuged for 7 seconds.
2. Ten microliters of the reaction mix was added into each sample tube.
3. Ten microliters of the RNA samples were pipetted to appropriate tube, and carefully mixed by pipetting.
4. The tubes were placed into thermocycler and incubated at 37° C for 30 minutes.
5. Dilution 1:2 for each obtained cDNA sample with TE-buffer (20microliters of the TE-buffer were added to each tube).

Primer:

10BEG. 16,10END. 722c, 10.374(5\ - ATGATTGATAAACTAACATC-3\ ), and 10.394c (5\ - GTAGTTAGTTTATCAATCAT-3\ ).

Amplification:

1. The quantity required of PCR-mix-1 tubes was prepared, including two additional tubes one for negative control of amplification and one for positive control of amplification.
2. Ten microliters of the PCR-mix-2 were added to the each tube.
3. Ten microliters of the cDNA sample were obtained after reverse transcription step was added to appropriated tube.
4. Ten microliters of the DNA-buffer were added to the tube for negative control of amplification.
5. Ten microliters of the rotavirus cDNA(C+) were added to the tube for positive control of amplification.

6. The PCR-mix-1tubes were closed and transferred them into the thermocycler only when temperature reached 95º C started the following program:

Thermocyclers with active temperature adjustment		
t Cº	**Time**	**Cyclers**
95Cº	Pause	
95Cº	5 minutes	1
95Cº	10 seconds	42
55Cº	25 seconds	
72Cº	25 seconds	
72Cº	1 minutes	1
4Cº	Storage	

3.2.4.3.2.1. Interpretation of results:

Analysis of PCR results were based on the presence or absence of specific bands of amplified DNA in the agarose gel (2%). The length of specific amplified DNA fragments was:

* The specific bands of the rotavirus in the gel were 280 basepairs.

* The specific bands of the rotavirus cDNA(+) in the gel were 280 base pairs.

* The nonspecific bands of the DNA-buffer in the gel were not 280 base pairs.

* Target region: NSP4.

3.2.4.3.3. Procedure of agarose gel electrophoresis:

The amplified DNA fragments resulted from PCR were separated by electrophoresis in 2% agarose gel slabs, for this purpose a horizontal gel slab apparatus was used by which the fitted ultraviolet transparent tray (with comb) was sealed from both sides with autoclave tape and placed on a level surface. The agarose gel was poured onto the tray. Once the gel solidified, the sealing tape was removed and the tray was set for

the above apparatus. The TBE-buffer was loaded into the electrophoresis apparatus at the level of few millimeters above the gel slab. The sample was loaded onto the wells of the gel and the electrophoresis apparatus was connected to power supply. The electrophoresis apparatus was carried out at 80Volt for 75minutes. The ultraviolet transparent tray containing the gel was removed and placed on U.V. visualized and photographed with camera.

3.2.4.4. Statistical analysis:

Data analyses was computer aided. Statistical analysis were done using SPSS (Statistical Package of Social Science) version 18 computer software. Frequency distribution and percentage for selected variables were done first.

The Chi-Square test was used for association between two variables, and the P value (Probability) estimated was considered statistically significant if it's less than 0.05.

Spearman correlation between screening tests and different parameters was done by evaluate r value (correlation coefficient) and P value (Probability), and an estimate was considered statistically significant if P value less than 0.05.

The validity of screening tests was examined by evaluate the sensitivity and specificity of tests (Niazi, 2004).

Whenever we examined the validity of a screening tests, we must compare the results with a confirmatory or referral test.

Results of a referral test (RT-PCR)				
Results of a screening test (DAT, ELISA)		**Yes**	**No**	**Total**
	Yes	a	b	a+b
	No	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	Total

a: True positive.

b: False positive.

c: False negative.

d: True negative.

The sensitivity of a screening test is (a / a+c).

The specificity of screening test is (d / b+d).

Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Science

A Comparative Study on Three Methods for Detection of Rotavirus from Patients with Diarrhea and Farm Animals

A Thesis

Submitted to the Council of the College of Education for Pure Science / Diyala University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biology / Microbiology

By

Ansam Dawood Salman

B. Sc. Biology

Supervised by

Professor
Adnan Namma Abdul-Ridha
College of Education for Pure Science
Diyala University

Assist Professor
Abdul-Razak Shafiq Hasan
College of Veterinary Medicine
Diyala University

2012 January **1432 Suffer**

Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Science

References

Abad, F.X.; Pintó, R.M. and Bosch, A. (1997). Disinfection of human enteric viruses on fomites. FEMS Microbiol. Lett. 156(1): 107-11.

Abad, F.X.; Pintó, R.M. and Bosch, A. (1994). Survival of enteric viruses on environmental fomites. Appl. Environ. Microbiol. 60(10): 3704-10.

Abbas, N.R.; Al-Hadithi, T.S.; Al-Attar, A.; Omer, A.R. and Al-Obadi, S. (1988). Incidence of rotavirus gastroenteritis among infants and young children in Baghdad. J. Comm. Med. 1: 39-42.

Ahmed, M.U.; Kobayashi, N.; Wakuda, M.; Sanekata, T.; Taniguchi, K.; *et al*. (2004). Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. J. Med. Virol. 72(1): 149-55.

Al-Falahi, R. (2002). Role of rotavirus gastroenteritis in children under three years of age hospitalized in Al-Ramadi maternity and children, hospital. Diploma thesis. College of Medicine, University of Al-Anbar.

Al-Kerwi, A.A.; Al-Samarai, A. and Yacoub, A.H. (1993). Prevalence of rotavirus infection in Basra: A community based study. J. East. Medit. Health. 7: 41-48.

Al-Kuheli, N.R. (2004). Gastroenteritis viruses among children under five years of age in Al-Ramadi City. M.Sc. thesis. Collage of Medicine Al-Anbar University.

Al-Naggar, S.M.; El-Bahy, M.M.; Abd Elaziz, J. and El-Dardiry, M.A. (2009). Detection of protozoal parasites in the stools of diarrheic patients using different techniques. J. Egypt Soc. Parasitol. 36(2):487-516.

Al-Wardi, H.A.; Al-Obaidi, A.M.; Al0Hadithi, T.S. and Omer, A.R. (1990). Rotavirus gastroenteritis in infants and young children in sadam city Baghdad. Saudi. Med. J. 11: 457-459.

Al-Yousif, Y.J.; Anderson, C.; Chard-Bergstrom , A.; Bustamante, M.; Muenzenberger, K.; Austin , and Kapil, S.(2001). Evaluation of a latex agglutination kit (Virogen Rota test) for detection of bovine rotavirus in fecal samples. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8: 496-8.

Aminu, M.; Esona, M.D.; Geyer, A. and Steele, A.D. (2009). Epidemiology of rotavirus infections in children in Northwestren Nigeria. J. Infect. Dis. 22: 445-47.

Anderson, E.J. and Weber, S.G. (2004). Rotavirus infection in adults. Lancet. Infect. Dis. 4(2): 91-9.

Arcangeletti, M.C.; De Conto, F.; Pinardi, F.; Medici, M.C.; Valcavi, P.; Ferraglia, F.; Motta, F.; Covan, S.; Calderaro, A.; Chezzi, C. and Dettori, G.(2005). Electron microscopy as a reliable tool for rapid and conventional detection of enteric viral agents: a five-year experience report. Acta. Biomed. 76(3):165-70.

Arias , C.F. ; Isa , P. ; Guerrero, C.A.; Mendez, E.; Zarate, S.; Lopez, T.; Espinosa, R.; Romero, P. (2002). Molecular biology of rotavirus cell entry. Arch. Med. Res. 33(4) : 356-61 .

Arnoldi, F.; Campagna, M.; Eichwald, C.; Desselberger, U. and Burrone, O.R. (2007). Interaction of rotavirus polymerase VP1 with non structural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. J. Virol. 81(5): 2128-37.

Arya, S.C. (1984). Rota viral infection and intestine lactase level. J. Infect. Dis. 150(5): 791.

Asensi, M.T.; Martinez-Costa, C. and Buesa, J. (2006). Anti-ratovirus antibodies in human milk: quantification and neutralizing activity. J. Pediatr Gastroenterol Nutr. 42(5): 560-7.

Ashbolt, N.J. (2004). Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. Toxicology. 198(1-3): 229-38.

Atchison, C.J.; Lopman, B.A.; Harris, C.J.; Tam, C.C.; Iturriza Gómara , M. and Gray, J.J. (2009). Clinical laboratory practices for the detection of rotavirus in England and Wales: can surveillance based on routine laboratory testing data be used to evaluate the impact of vaccination. Euro Surveill. 14(20): 19217.

Baker, M. and Prasad, B.V. (2010). Rotavirus cell entry. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 343: 121-48.

Ball, J.M.; Mitchell, D.M.; Gibbons, T.F. and Parr, R.D. (2005). Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. Viral. Immunol. 18(1): 27-40.

Bányai, K.; Bogdán, A.; Domonkos, G.; Kisfali, P.; Molnár, P.; Tóth, A.; Melegh, B.; Martella, V.; Gentsch, J.R. and Szucs, G. (2009). Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. J. Med. Viro. l81(2): 362-70.

Bartlett, C. (1996). An overview of emerging food borne and waterborne disease. East. Medit. Health. J. 2(1): 51-60.

Bell, L.M.; Clark, F.; Arbeter, A.M. and Plotkin, S.A. (1988). Rotavirus serotype specific neutralizing activity in human milk. Res. Virol. 142: 275-8.

Bereciartu, A.; Bok, K.; Gomez , J. (2002). Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. J. Clin. Virol. 43(1):1-8.

Bernstein, D.I. (2009). Rotavirus overview. Pediatr. Infect. Dis. J. 28(3): 550-3.

Bishop, R. (2009). Discovery of rotavirus: Implications for child health. J. Gastroenterol. Hepatol. 24 (3): S81-5.

Bishop, R.F.; Davidson, G.P.; Holmes, I.H. and Ruck, B.J. (1993). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet J. 2(7841): 1281-3.

Black, R.E.; Cousens, S.; Johnson, H.L.; Lawn, J.E.; Rudan, I.; Bassani, D.G.; Jha, P.; Campbell, H.; Walker, C.F.; Cibulskis, R.; Eisele, T.; Liu, L.; Mathers, C. and Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. (2010). Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. Lancet. 375(9730): 1969-87.

Blutt, S.E.; Crawford, S.E.; Warfield, K.L.; Lewis, D.E.; Estes, M.K. and Conner, M.E. (2004). The VP7 outer capsid protein of rotavirus induces polyclonal B-cell activation. J. Virol. 78(13): 6974-81.

Borghan, M.A.; Mori, Y.; El-Mahmoudy, A.B.; Ito, N.; Sugiyama, M.; Takewaki, T. and Minamoto, N. (2007). Induction of nitric oxide synthase by rotavirus enterotoxin NSP4: implication for rotavirus pathogenicity. J. Gen. Virol. 88(7): 2064-72.

Boschi-Pinto, C.; Velebit, L. and Shibuya, K. (2008). Estimating child mortality due to diarrhea in developing countries. Bull. World Health Organization. 86(9).

Both, G.W.; Bellamy, A.R. and Mitchell, D.B. (1994). Rotavirus protein structure and function. Curr.Top. Microbiol.Immunol. 185: 67-105.

Brody, J.R. and kern, A.P. (2004). History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. Anal. Bio. Chem. 333(1): 1-13.

Brooks, G; Carroll, K.C.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2007). Reoviruses, Rotaviruses, and Caliciviruses. In: Medical microbiology. 24th Ed. 2007. McGraw Hill. pp 501-33.

Broor, S.; Ghosh, D. and Mathur, P. (2003). Molecular epidemiology of rotaviruses in India. J. Med. Res. 118: 59-67.

Bucardo, F.; Karlsson, B.; Nordgren J.; *et al.* (2007). Mutated G4P [8] rotavirus associated with nationwide outbreak of gastroenteritis in Nicaragua in 2005. J.Clin. Microbiol . 45(3): 990-7.

Buesa, J., Colomina, J.; Raga, A.; Villanueva, A. and Prat, J. (1996). Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for detection of rotaviruses: applications of the assay. Res. Virol. 147: 353-361.

Carraro, E.; Perosa, A.H.; Siqueira, I.; Pasternak, J. and Martino, M.D. (2008). Rotavirus infection in children a tertiary hospital of Sao Paulo. Brazil. Braz. J. Infect. 12(1): 44-6.

Castello, A.A.; Arvay, M.L.; Glass, R.I. and Gentsch, J. (2004). Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. Pediatr. Infect. Dis. 23(10): 168-72.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2009). Reduction in rotavirus after vaccine introduction. United States, 2000-2009. Morbidity and Mortality Weekly Report. 58(41): 1146-9.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2008). Rotavirus surveillance world-wide, 2001-2008. Morb Mortal Wkly Rep. 57(46): 1255-7.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2011). Rotavirus surveillance world-wide, 2009. Morb Mortal Wkly Rep. 60(16): 514-6.

Cetinkurt, A. and Jurgen, B. (2005). Sodium hydroxide. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Weinheim: Wiley. 4- 345.

Chan, W.; Thongprachum, A.; Dey, S.K.; Phan, T.G.; Khamrin, P.; Okitsu, S.; Nishimura, S.; Kobayashi, M.; Kikuta, H.; Baba, T.; Yamamoto, A.; Sugita, K.; Hashira, S.; Tajima, T.; Ishida, S.; Mizuguchi, M. and Ushijima H. (2011). Detection and genetic characterization of rotavirus infections in non-hospitalized children with acute gastroenteritis in Japan, 2007-2009. Infect Genet Evol. 11(2): 415-22.

Chandran, A.; Heinzen, R.R.; Santosham, M. and Siberry, G.K.(2006). Nosocomial rotavirus infections: a systematic review. J. Pediatr. 149(4): 441-7.

Chitambar, S.D.; Tatte, V.S.; Dhogde, R. and Kalrao, V. (2008). High frequency of rotavirus viremia in children with acute gastroenteritis: discordance of strains detected in stool and sera. J. Med. Virol. 80(12): 2169-765.

Conner, M.E. and Raming, R.F. (1997). Viral enteric diseases, P. 713-743. In: N. Nathanson (ed), Viral pathogenesis. Lippincott-Reven Publishers, Philadelphia.pp 34-35.

Cook, J.P. and McCrae, M.A. (2004). Sequence analysis of the guanylyltransferase (VP3) of group A rotaviruses. J. Gen. Virol. 85(Pt 4): 929-32.

Cook, N.; Bridger, J.; Kendall, K.; Gomara, M.I.; El-Attar, L. and Gray, J. (2004). The zoonotic potential of rotavirus. J. Infect. 48(4): 289-302.

Costa, P.S.; Cardoso, D.D.; Grisi, S.J.; Silva, P.A.; Fiaccadori, F.; Souza, M.B. and Santos, R.A. (2004). Rotavirus A infections and reinfections: genotyping and vaccine implications. J. Pediatr. 80(2): 119-22.

Coulson, B.S. (1996). VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies. Arch. Virol. 12: 113-8.

Coulson, B.S.; Unicomb, L.E.; Pitson, G.A. and Bishop, R.F. (1987). Simple and specific enzyme immunoassay using monoclonal antibodies for serotyping human rotaviruses. J. Clin. Microbiol . 25: 509-15.

de Beer, M.; Peenze, I.; da Costa, V.M. and Steele, A.D. (1997). Comparison of electron microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination for the detection of bovine rotavirus in faeces. J.S. Afr. Vet. Assoc. 68(3):93-6.

de Verdier Klingenberg, K. and Svensson, L. (1998). Group A rotavirus as a cause of neonatal calf enteritis in Sweden. Acta. Vet. Scand. 39(2): 195-9.

Dennehy, P.H. (2008).Rotavirus vaccines: an overview. Clin. Microbiol. Rev. 21 (1): 198–208.

Desselberger, U. (1996). Genome rearrangements of rotaviruses. Arch. Virol. Suppl. 12: 37-51.

Desselberger, U.; Wolleswinkel-van den Bosch, J.; Mrukowicz, J.; Rodrigo, C.; Giaquinto, C. and Vesikari, T. (2006). Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. Pediatr. Infect. Dis. J. 25 (1): 30–41.

Dhama, K.; Chauhan, R.S.; Mahendran, M. and Malik, S.V. (2009). Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. Vet. Res. Commun. 33(1): 1-23.

Diggle, L. (2007). Rotavirus diarrhea and future prospects for prevention. Br. J. Nurs. 16(16): 970-4.

Dulbecco, R. and *et al*. (1974). Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. Exp. Med. Vol. 99(2): 167-182.

DuPont, H.L. (2009). Clinical practice. Bacterial diarrhea. N. Engl. J. Med. 361(16): 1560-9.

Esteghamati, A.; Gouya, M.; Keshtkar, A.; Najafi, L.; Zali, M.R.; Sanaei, M.; Yaghini, F.; El-Mohamady, H.; Ptel, M.; Kelena, J.D. and Teleb, N. (2009). Sentinel hospital - based surveillance of rotavirus diarrhea in Iran. J. Infect. Dis. 200: 5244-7.

Estes, M. K. (2001). Rotaviruses and their replication, p. 1747-1785. *In* : Knipe D.M. and Howley P. M (ed.), Fields virology. Lippencot- Raven Publishers, Philadelphia Estes, M. K. 2001.

Ferreira, T.; Becho, M.; Bernardo, A.; *et al.*(2006). Performance of a latex agglutination test in the diagnosis of acute gastroenteritis by rotavirus. Braz. J. Microbiol. 37(4): 587-9.

Fischer, T.K. and Gentsch, J.R. (2004). Rotavirus typing methods and algorithms. Rev. Med. Virol. 14(2): 71-82.

Fischer, T.K.; Valentiner-Branth, P.; Steinsland, H.; Perch, M.; Santos, G.; Aaby, P.; Mølbak, K. and Sommerfelt, H. (2002). Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, west Africa. J. Infect. Dis. 86(5): 593-7.

Fischer, T.K.; Viboud, C.; Parashar, U.; *et al.* (2007). Hospitalization and death from diarrhea and rotavirus among children < 5 years of age in the United State, 1993-2003. J. Infect. Dis. 195(8): 1117-25.

Fleming, F.E.; Graham, K.L.; Taniguchi, K.; Takada, Y. and Coulson, B.S. (2007).Rotavirus-neutralizing antibodies inhibit virus binding to integrins alpha 2 beta 1 and alpha 4 beta 1. Arch. Virol. 152(6):1087-101.

Forster, J.; Guarino, A.; Parez, N.; Moraga, F.; Román, E.; Mory, O.; Tozzi, A.E.; de Aguileta, A.L.; Wahn, U.; Graham, C.; Berner, R.; Ninan, T.; Barberousse, C.; Meyer, N. and Soriano-Gabarró, M. (2009). The Rotavirus Study Group. Hospital-based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis among European children younger than 5 years of age. Pediatrics. 123(3): 393-400.

Frias, A.H.; Vijay-Kumar, M.; Gentsch, J.R.; Crawford, S.E.; Carvalho, F.A.; Estes, M.K. and Gewirtz, A.T. (2010).Intestinal epithelia activate anti-viral signaling via intracellular sensing of rotavirus structural components. Mucosal Immunol. 3(6): 622-32.

Frieden, T.R.; Jaffe, H.W.; Stephens, J.W.,; Thacker, S.B. and Zaza, S. (20011). Rotavirus surveillance --- worldwide, 2009. Morb. Mortal. Wkly. Rep.60(16): 514-6.

Gardet, A.; Breto , M.; Fontanges, P.; Trugnan, G. and Chwetzoff, S. (2006). Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies. J. Virol. 80(8): 3947-56.

Gentsch, J.R.; Laird, A.R.; Bielfelt, B.; Griffin, D.D.; Banyai, K.; Ramachandran, M.; Jain, V.; Cunliffe, N.A.; Nakagomi, O.; Kirkwood, C.D.; Fischer, T.K.; Parashar, U.D.; Bresee, J.S.; Jiang, B. and Glass, R.I. (2005). Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. J. Infect. Dis. 192 (1): 146-59.

Gentsch, J.R.; Woods, P.A.; Ramachandran, M.; Das, B.K.; Leite, J.P.; Alfieri, A.; Kumar, R.; Bhan, M.K. and Glass, R.I. (1996). Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. J. Infect. Dis. 174(1): 30-6.

Ghazi, H.O.; Khan, M.A.; Telmesani, A.M.; Idress, B. and Mahomed, M.F.(2005). Rotavirus infection in infants and young children in Makkah, Saudi Arabia. J. Pak. Med. Assoc. 55(6): 231-4.

Ghosh, S.; Alam, M.M.; Ahmed, M.U.; Talukdar, R.I.; Paul, S.K. and Kobayashi, N. (2010). Complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. J. Gen. Virol. 91(Pt 9): 2367-73.

Ghosh, S.; Kobayashi, N.; Nagashima, S.; Chawla-Sarkar, M.; Krishnan, T.; Ganesh, B. and Naik, T.N. (2010). Molecular characterization of the VP1, VP2, VP4, VP6, NSP1 and NSP2 genes of bovine group B rotaviruses: identification of a novel VP4 genotype. Arch. Virol. 155(2): 159-67

Gonzalez, R.; Salas-Maronsky, H.; Balebona, E.; Martinez, J.R.; Serrano, N. and Perez-Schael, I. (2008). Epidemiological and clinical study of diarrhea by rotavirus in children < 5 years of age attended in medical of the Miranda Stats, Venezuela. Invest. Clin. 49(4): 449-510.

Grandy, G.; Medina, M.; Soria, R.; Terán, C.G. and Araya, M. (2010). Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children. BMC Infect. Dis. 10: 253.

Gray, J. and Iturriza-Gómara, M. (2011). Rotaviruses. Methods Mol. Biol. 665: 325-55.

Gray, J.; Vesikari, T.; Van Damme, P.; Giaquinto, C.; Mrukowicz, J.; Guarino, A.; Dagan, R.; Szajewska, H. and Usonis, V. (2008). Rotavirus. J. pediatr. Gastroenterol. Nutr 46 (2): 24-31.

Greenberg, H.B.; Clark , H.F. ; Offit , P.A. (1994). Rotavirus pathology and pathophysiology . Curr. Top. Microbial. Immunol. 185 : 255-83 .

Greenberg, H.B. and Estes, M.K. (2009). Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. Gastroenterology . 136(6): 1939-51.

Grimwood, K.; Huang, Q.S.; Cohet, C.; Gosling, I.A.; Hook, S.M.; Teele, D.W.; Pinnock, R.E.; Nicholson, W.R.; Graham, D.A.; Farrell, A.P.; Leadbitter, P. and Lennon, D.R. (2006). Rotavirus hospitalisation in New Zealand children under 3 years of age. J. Pediatr. Child. Health.42(4):196-203.

Guandalini, S. (2011). Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. J. Clin.Gastroenterol. 45: S149-53.

Gupte, S. (1996). Rotaviruses. In: The Short Textbook of Pediatrics(1994). 7th Ed. Jaypee brothers medical publishers. pp 255-290.

Hamza, I.A.; Jurzki, L.; Stang, A.; Sure, K.; Uberla, K. and Wilhelm, M. (2009). Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. Water Res. 43(10): 2657-68.

Hasan, A.Sh.; Al-Azzawi, D.H.; Al-Duliami, A.A. and Al-Azzawi, K.Y. (2011a). Anti-rotavirus IgG seropositivity among healthy popylation and patients with acute diarrhea in Baquba-Diyala province. Iraqi J. Commun. Med.. 24(2): 100-4.

Hasan, A.Sh.; Al-Duliami, A.A.; Mehdi, Sh. and Al-Azzawi, K.Y. (2011b). The prevalence of rotavirus infection in Baquba-Diyala province. Iraqi J. Commun. Med. 24(3): 200-4.

Hirata, Y.; Broquet, A.H.; Menchen, L. and Kagnoff, M.F. (2007). Activation of innate immune defense mechanisms by signaling through R1G-1 / 1P5-1 in intestinal epithelial cells. J. Immunol. 179: 5425-32.

Hoshino,Y.; Jones, R.W. and Kapikian, A.Z. (2002). Characterization of neutralization specificities of outer capsid spike protein VP4 of select murine , lapine , and human rotavirus strains . Virology, 299(1) : 64-71 .

Hoshino, Y. and Kapikian, A. Z. (2000). Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. J. Health Popul. Nutr. 18(1): 5-14.

Hou, Z.; Huang, Y.; Huan, Y.; Pang, W.; Meng, M.; Wang, P.; Yang, M.; Jiang, L.; Cao, X. and Wu, K.K. (2008).Anti-NSP4 antibody can block rotavirus-induced diarrhea in mice. J. Pediatr Gastroenterol Nutr. 46(4): 376-85.

Huang, Q. and Fu, W.L. (2005). Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agaros gel electrophoresis. Clin. Chem. Lab. Med. 43(8): 841-2.

Husain, M.; Sejh, P. and Broor, S. (2010). Detection of group A rotavirus by reverse transcription- polymerase chain reaction in feces from children with acute gastroenteritis. Archives of Virology. 140(7): 1225-1233.

Hyser, J.M .; Collinson-Pautz, M.R.; Utama, B. and Estes, M.K. (2010). Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. MBio. 1(5): 33-36.

Intusoma, U.; Sornsrivichai, V.; Jiraphongsa, C. and Varavithaya, W. (2008). Epidemiology, clinical presentations and burden of rotavirus diarrhea in children under five seen at Ramathibodi hospital, Thiland. J. Med. Assoc. Thai. 91(9): 1350-5.

Isa, P.; Arias, C.F. and López, S. (2006). Role of sialic acids in rotavirus infection. Glycoconj J. 23(1-2): 27-37.

James, V.L.; Lambden, P.R.; Deng, Y.; Caul, E.O. and Clarke, I.N. (1999). Molecular characterization of human group C rotavirus genes 6, 7 and 9. J. Gen. Virol. 80 (12): 3181-7.

Jarasvech, C.; Geoffrey, Y.; Akit, A.E.; Castro, B.I. and Osbun, L. (1993). PCR detection of group A bovine rotaviruses in feces. J. Vet. Diagn. Invest. 5: 516-521.

Jayaram, H.; Estes, M.K. and Prasad, B.V. (2004). Emerging themes in rotavirus cells entry, genome organization, transcription and replication. Virus Res. 101(1) : 67-81.

Jiang, B.; Gentsch, J.R. and Glass, R.I. (2002). The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease an overview. Clin. Infect. 34(10): 1351-61.

Jiang ,S.; Ji, S.; Tang, Q.; Cui, X.; Yang, H.; Kan, B. and Gao, S. (2008). Molecular characterization of a novel adult diarrhoea rotavirus strain J19 isolated in China and its significance for the evolution and origin of group B rotaviruses. J. Gen. Virol. 89(10): 2622-9.

Jinda, N.; Patnayak, P.; Hander, C.; Ziegler, A.F. and Goyal, S.M. (2010). Detection and molecular characterization of enteric viruses from poult enteritis syndrome in turkeys. Poultry Science. 89: 217-26.

Junaid, S.A.; Umeh, C.; Olabode, A.O. and Banda, J.M. (2011). Incidence of rotavirus infection in children with gastroenteritis attending Jos university teaching hospital, Nigeria. Virol. J. 8: 233.

Kaminjolo, J.S. and Adesiyun, A.A. (1994). Rotavirus infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. Brit. Vet. J. 150(3): 293-9.

kapikian, A.Z.; Hoshino, Y. and Chanock, R.M. (2001). Rotaviruses. In: Fields Virology, 4th ed.

kapikian A.Z. ; wyatt , R.G. ; Greenberg , H.B. ; Kalica , A.R. ; Kim , K.W. ; Brandt , C.D. ; Rodriguez , W.J. ; Parrot , R.H. ; and Chanock , R.M. (1980) . Approaches to immunization of infants and young children against gastroenteritis due to rotavirus. Rev. Infect. Dis. 2 : 459 .

Kaplan, N.M.; Kirby, A.; Abd-Eldayem, S.A. Dove, W.; Nakagomi, T.; Nakagomi, O. and Cunliffe, N.A. (2011). Detection and molecular characterisation of rotavirus and norovirus infections in Jordanian children with acute gastroenteritis. Arch. Virol. 156(8):1477-80.

Karpenko, V. and Norris, J.A. (2001). Vitrol in the history of chemistry. Chem. Listy. 96: 997.

Kasempimolporn, S.; Louisirirotchanakul, S.; Sinarachatanant, P. and Wasi, C. (1988). Polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining for detection of rotavirus in stools from diarrheic patients in Thailand. J. Clin. Microbiol. 26(1): 158-60.

Kelkar, S.D. and Zade, J.K. (2004). Group B rotaviruses similar to strain GAL, have been circulating in Western India since 1993. Epidemiol. Infect. 132(4): 745-9.

Khamrin, P.; Maneekar , N.; Peerakome , S.; Malaso, R.; Chanit , W.; *et al.* (2009). Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5 16 genes identifies an unusual G3 [10] human rotavirus strain. J. Med. Virol. 81(1): 176-82.

Khamrin, P.; Tran, D.N.; Chan-it, W.; Thongprachum, A.; Okitsu, S.; Maneekarn, N. and Ushijima, H. (2011). Comparison of the rapid methods for screening of group a rotavirus in stool samples. J. Trop. Pediatr. 57(5): 375-7.

Kheyami, A.M.; Cunliffe, N.A. and Hart, C.A.(2006). Rotavirus infection in Saudi Arabia. Ann. Saidi Med. 26(3):184-91.

Kheyami, A.M.; Areeshi, M.Y.; Dove, W.; Nakagaomi, O.; Cunliffe, N.A.; *et al.* (2008). Characterization of rotavirus strains detected among children and adults with acute gastroenteritis in Gizan, Saudi Arabia. Saudi Med. J. 29(1): 90-3.

Kirkwood, C.D. (2010). Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. Journal of Infectious Diseases. 202: 43-8.

Kho, H.; Baek, S.Y.; Shin, J.I.; Chung, K.S. and Jee, Y.M. (2008). Co infection of viral agents in Korean children with acute watery diarrhea. J. Korea Med. Sci. 32(6): 937-40.

Klingenberg, K. and Svensson, L. (1998).Group A rotavirus as a cause of neonatal calf enteritis in Sweden. Acta. Vet. Scand. 39(2): 195-9.

Kohno, H.; Akihara, S.; Nishio, O. and Ushijima, H. (2000). Development of a simple and rapid latex test for rotavirus in stool samples. Pediatr. 42(4): 395-400.

Koopman, J.S.; Brown, D. (1999). Seasonality and diversity of group A rotaviruses in Europe. Acta paediatrica. Supplement. 88(426): 14-9 .

Koroglu, M.; Yakupogullari, Y.; Otlu B.; Ozturk, S.; Ozden, M.; Ozer, A.; Sener, K.and Durmaz, R. (2011). A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. New Microbiol. 34(1): 17-24.

Kuzuya, M.; Fuji, R.; Hamano, M.; Nishijima, M. and Ogura, H. (2007). Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture Jaban, between 1986 and 2005. J. Med. Virol. 79(8): 1219-28.

Lamhoujeb, S.; Cook, A.; Pollari, F.; Bidawid, S.; Farber, J. and Mattison, K. (2010). Rotaviruses from Canadian farm samples. Arch. Virol. 155(7): 1127-37.

Leung, A.K.; Kellner, J.D. and Davies, H.D. (2005). Rotavirus gastroenteritis. Adv. Ther. 22(5): 476-87.

Levy, K.; Hubbard, A.E. and Eisenberg, J.N. (2009). Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. Int. J. Epidemiol. 38(6): 1487-96.

Liddle, J.L.; Burgess, M.A.; Gilbert, G.L.; Raph, H.M.; Mclntyre, P.B.; et al., (1997). Rotaviruses gastroenteritis: impact on young children, their families and the health care system. Med. J. Virol. 6: 304-7.

Liu, K.; Yang, X.; Wu, Y. and Li, J.(2009). Rotavirus strategies to evade host antiviral innate immunity. Immunol Lett. 127(1): 13-8.

Logan, C.; Leary, J.J. and Sullivan, N. (2006). Real time- RT-PCR for detection of rotavirus and adenovirus a causative agents of acute viral gastroenteritis in children. J. Clin. Microbiol. 44(9): 3189-95.

Lorrot, M. and Vasseur, M. (2007). Review how do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea. J. Virol. 4: 31.

Lorrot, M. and Vasseur, M. (2007). Physiopathology of Rotavirus diarrhea. Arch. Pediatr. 14(3): 145-51.

Lucchelli, A.; Lance, S.E.; Bartlett, P.B.; Miller, G.Y. and Saif, L.J.(1992). Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. Am. J. Vet. Res. 53(2): 169-74.

Ludert, J.E.; Ruzi, M.C.; Hidalgo, C. and Liprendi, F. (2002). Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation. J. Virol. 76(13): 6643-51.

Lundgren, O. and Svensson, L. (2001). Pathogenesis of rotavirus diarrhea. Microbes Infect. 3(13): 1145-56.

Lynch, M.; Sheih, W.J.; Tatti, K.; Gentsch, J.R.; Jiang, B.; Greenwald, M.; Zaki,S.R.; *et al*. (2003). The pathology of rotavirus associated deaths using new molecular diagnostics. J. Clin. Infect. Dis. 37: 1327-133.

Malek, M.A.; Teleb, N.; Abu-Elyazeed, R.; Riddle , M.S.; Sherif , M.E.; Steele, A.D.; Glass, R.I. and Bresee, J.S. (2010). The epidemiology of rotavirus diarrhea in countries in the Eastern Mediterranean Region. J. Infect. Dis. 202: 512-22.

Malik, J.; Bhan, M.K. and Ray, P. (2008). Natural immunity to rotavirus infection in children. Indian J. Biochem. Biophys. 45(4): 219-28.

Maniatis, T.; Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning fourth ed. Cold spring Harbor Laboratory. New York.

Martella, V.; Bányai, K.; Matthijnssens, J.; Buonavoglia, C. and Ciarlet, M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. Vet. Microbiol. 140(3-4): 246-55.

Matsom, D.O. (2006). The prevalent rotavirus vaccine, Rota Teq. Semin. Pediatr.Infect.Dis. 17(4): 195-9.

Matthijnssens, J.; Bilcke, J.; Ciarlet, M.; Martella, V.; Bányai, K.; Rahman, M.; Zeller, M.; Beutels, P.; Van Damme, P. and Van, R. M. (2009). Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. Future Microbiology 4(10): 1303-16.

Matthijnssens, J.; Ciarlet, M.; McDonald, S.M.; Attoui, H.; Bányai, K.; Brister, J.R.; Buesa, J.; Esona, M.D.; Estes, M.K.; Gentsch, J.R.; Iturriza-Gómara, M.; Johne, R.; Kirkwood, C.D.; Martella, V.; Mertens, P.P.; Nakagomi, O.; Parreño, V.; Rahman, M.; Ruggeri, F.M.; Saif, L.J.; Santos, N.; Steyer, A.; Taniguchi, K.; Patton, J.T.; Desselberger, U, and Van, R. M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Arch. Virol. 156(8): 1397-413.

Mertens, P. (2004). The ds RNA viruses. Virus Res. 101: 3-13.

Montykrieger, K.; Matthew, P.; Matsudaria, P.T.; Lodish, H.F.; Darnell, S.; James, E.; Lawrenc, Z.; Kaiser, C. and Arnold, B. (2004). Rotaviruses. In:

Molecular cell biology (2004). 5th ed. New York: W.H. Freeman and C.O. Isbno. pp 7167-4366.

Muller, M. and Johne, R. (2007). Rotaviruses: diversity and Zoonistic potential – a brief review. Berl. Munch. Tieraztl. Wochenschr. 120(3-4): 108-12.

Muñoz, M.; Alvarez, M.; Lanza, I. and Cármenes, P. (1995). An outbreak of diarrhoea associated with atypical rotaviruses in goat kids. Res. Vet. Sci. 59(2): 180-2.

Muñoz, M.; Alvarez, M.; Lanza, I. and Cármenes, P. (1996). Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhea in lambs and goat kids in Spain. Epidemiol. Infect. 117(1): 203-11.

Nafi, O. (2010). Rotavirus gastroenteritis among children aged under 5 years in Al Karak, Jordan. East Mediterr. Health. J. 16(10): 1064-9.

Nataraju, S.M.; Chattopadhyay, U.K. and Krishnan, T. (2009). A study on the possibility of zoonotic infection in rotaviral diarrhoea among calves and buffalo calves in and around Kolkata, India. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 13(1): 7-11.

Newburg, D.S.; Peterson, J.A.; Ruiz, G.M.; Matson, D.O.; Morrow, A.L.; *et al*. (1998). Rolr of human milk lactaherin in protection against symptomatic rotavirus infection. Lancet. 351: 1160-4.

Nguyen, T.A.; Khamrin, P.; Trinh, Q.D.; Phan, T.G.; Pham le, D.; Hoang le, P.; Hoang, K.T.; Yagyu, F.; Okitsu, S. and Ushijima, H. (2007). Sequence analysis of Vietnamese P[6] rotavirus strains suggests evidence of interspecies transmission. J. Med. Virol. 79(12): 1959-65.

Niazi, A.D. (2004). Statistical analysis in medical research. 2nd edition.

O'Ryan, M. (2009). The ever-changing landscape of rotavirus serotypes. Pediatr. Infect. Dis. 28(3): 60-2.

O'Ryan, M. (2007). Rotarix (RIX 441.1): an oral human rotavirus vaccine. Expert Review of vaccines. 6(1): 11-9.

O'Ryan, M. and Linhares, A.C. (2009). Update on Rotarix: an oral human rotavirus vaccine. Expert. Rev. Vaccines. 8(12): 1627-41.

Pamela, K. and Molyneaux, P.J. (1995). Human immunity to rotavirus. J. Med. Microbiol. 43(6): 397-404.

Parashar, U.D.; Gibson, C.J.; Bresse, J.S. and Glass,R.I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. Emerg. Infect. Dis. 12: 304-6.

Park, S.; Oh, S.; Lee, J.; Park, G.; Choi, S.; Chae, Y. and Kim, H. (2011). Genotypes of rotavirus associated with acute gastroenteritis in Seoul, Korea. Microbiol. Immunol. 55(9):641-4.

Pereira L.A.; Raboni, S.M.; Nogueira, M.B.; Vidal, L.R.; Almeida, S.M.; Debur, M.C. and Cruz, C. (2011). Rotavirus infection in a tertiary hospital: laboratory diagnosis and impact of immunization on pediatric hospitalization. Braz. J. Infect. Dis. 15(3): 215-9.

Pérez-Vargas, J.; Romero, P.; López, S. and Arias, C.F. (2006). The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. J. Virol. 80(7): 3322-31.

Pesavento, J.B.; Crawford, S.E.; Estes, M.K. and Prasad, B.V. (2006). Rotavirus protein: structure and assembly. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 309: 189-219.

Phan, T.G.; Nguyen, T.A.; Nishimure, S.; Nishimura, T.; Yamamoto, A.; *et al*. (2005). Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: virus diversity and genetic analysis of sap virus. Arch. Virol. 150(7): 1415-24.

Pirkooh, A. and Shahrabadi, M. (2007). Development of a latex agglutination method for diagnosis of rotavirus infections. Iran J. Med. 32(2): 100-4.

Plosker, G.L. (2010). Pentavalent rotavirus vaccine (RotaTeq): a review of its use in the prevention of rotavirus gastroenteritis in Europe. Drugs. 70(9): 1165-88.

Prasad, B.V. and Chiu, W. (1994). Structure of rotavirus. Curr.Top. Microbiol.Immunol.185: 9-29.

Rainford, E.W. and Mccrae, M.A. (2007). Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. Virus Res. 130(1-2) : 193-201 .

Ramani,S. and Kang, G. (2007). Burden of disease & molecular epidemiology of group A rotavirus infections in India. Indian. J. Med. Res. 125(5):619-32.

Ramani, S.; Sankaran, P.; Arumugam, R.; Sarkar, R.; Banerjee, I.; Mohanty, I.; Jana, A.K.; Kuruvilla, K.A. and Kang, G. (2010). Comparison of viral load and duration of virus shedding in symptomatic and asymptomatic neonatal rotavirus infections. J. Med. Virol. 82(10): 1803-7.

Ramig, R.F. (1997). Genetics of the rotaviruses. Annu. Rev. Microbiol. 51: 225-55.

Ramig, R.F. (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infections. J. Virol. 78 : 10213-20 .

Ray, P.G.; Kellar, S.D. (2009). Measurement of antirotavirus IgM/ IgG responses in the serum samples of Indian children following rotavirus diarrhea and their months. J. Med. Virol. 72(3): 416-23.

Ray, P.G.; Kellar, S.D.; Walimbe, A.M.; Biniwale, V. and Mechendale, S. (2007). Rotavirus immunoglobulin levels among Indian mothers of two socio-ecomic groups and occurrence of rotavirus infections among their infants up to six months. J. Med. Virol. 79(3): 341-9.

Rinaldi, M.; Brierley, E. and Bekker, A. (2009). Donor breastmilk saved infant lives during an outbreak of rotavirus in South Africa. Breastfeed Med. 4(2): 133-4.

Rodríguez-Díaz, J.; Montava, R.; García-Díaz, A. and Buesa, J. (2005). Humoral immune response to rotavirus NSP4 enterotoxin in Spanish children. J. Med. Virol. 77(2): 317-22

Rosai, J. and Ackerma, L.V. (2004). Special techniques in syr gical. In: Pathology 9th Ed. Edinburg, London, NewYork.

Ruiz, M.C.; Leon, T.; Diaz, Y. and Michelangeli, F. (2009). Molecular biology of rotavirus entry and replication. Scientific World Journal. 9: 1476-97.

Ruiz-Palacios, G.M.; Perez, S. and Velazquez, F.R. (2006). Safety and efficiency of an attenuated vaccine against sever rotavirus gastroenteritis. N. Engl. J. Med. 354(1): 11-22.

Samal, S.K.; Dopazo, C.P.; Mephillips, T.H.; Baya, A.; Mohanty, S.B. and Hetrick, F.M. (1996). Molecular characterization of rotavirus like virus isolated from striped bass. J. Virol. 64: 5235-5240.

Santos, N. and Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. Rev. Med. Virol. 15 (1): 29–56.

Scarcella, C.; Carasi, S.; Cadoria, F.; Macchi, L.; Pavan, A.; *et al.* (2009). An outbreak of viral gastroenteritis linked to municipal water supply, Lombardy, Italy, June, 2009. Euro. Surveill. 14(29): 19274.

Schael, I.P.; Gonzales, R. and Salinas, B. (2009). Severity and age of rotavirus diarrhea, but not socioeconomic conditions, are associated with rotavirus seasonality in Venezuela. J. Med. Virol. 81(3): 562-7.

Schuman, T.; Hotzel, H.; Otzel, H.; Otto, P. and Johne, R. (2009). Evidence of inter species transmission and reassortment among avian group A rotavirus. Virology. 386(2): 334-43.

Sdiri-Loulizi, K.; Ambert-Balay, K.; Gharbi-Khelifi, H.; Hassine, M.; Chouchane, S.; Sakly, N.; Neji-Guédiche, M.; Pothier, P. and Aouni, M. (2011). Molecular epidemiology and clinical characterization of group

A rotavirus infections in Tunisian children with acute gastroenteritis. Cand. J. Microbiol. 57(10):810-9.

Selim, S.A.; Aziz, K.M.; Sarker, A.J. and Rahman, H. (1991). Rotavirus infection in calves in Bangladesh. Vet. Res. Commun. 15(4): 327-33.

Steyer, A.; Poljsak-Prijatelj, M.; Barlic-Maganja, D. and Marin, J. (2008). Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. J. Gen. Virol. 89(7): 1690-8.

Strauss, J.H. and Strauss, E.G. (2008). Viruses that contain double-stranded RNA: Family *Reoviridae*. In: Viruses and Human Disease. 2nd. Ed. 2008. Academic Press, PP 193-209.

Taraporewala, Z.F. and Patton, J.T. (2004). Non structural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. Virus Res. 101(1): 57-66.

Trask, S.D.; Kim, I.S.; Harrison, S.C. and Dormitzer, P.R. (2010). A rotavirus spike protein conformational intermediate binds lipid bilayers. J. Virol. 84(4): 1764-70.

Tayeb, H.T.; Al-Ahdal M.N.; Carrear, M.J.; Al-Qahtani, A.A.; Delacruz, D.M. (2010). Molecular epidemiology of human rotavirus infections in Saudi Arabia pediatric patients. J. Med. Virol. 82(12): 2038-42.

Uhde, F.L.; Kaufmann, T.; Sager, H.; Albini, S.; Zanoni, R.; Schelling, E. and Meylan, M. (2008). Prevalence of four enteropathogens in the feces of young diarrheic dairy calves in Switzerland. Vet. Rec. 163(12): 362-6.

Vainio, K.; Nordbø, S.A.; Njølstad, G.; Størvold, G.; Døllner, H.; Midgaard, C.; Bosse, F.J.; Rognlien, A.G.; Rojahn, A.; Wathne, K.O. and Flem, E. (2009). Detection and characterization of group A rotaviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Norway, 2006-2008. J. Med. Virol. 81(10):1839-44.

Van, W.B.; Page, N.A.; Grabow, W.O.; Steele, A.D. and Taylor, M.B. (2006). Molecular epidemiology of group A rotaviruses in water sources and selected raw vegetables in southern Africa. Appl. Environ Microbiol. 72(7): 4554-60.

Vasquez-delcarpio, R.; Morales, J.L.; Barro , M.; ricardo , A.; Spenecer , E.(2006). Bioinformatics predication of polymerase elements in the rotavirus VP1 protein. Biol. Res. 39(4): 649-59.

Velazquez, F.R. (2009). Protective effects of natural rotavirus infection. Pediatr. Infect. Dis. J. 28(3): 54-6.

Velazquez, F.R.; *et al*. (2000). Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. J. Infect. Dis. 182(6): 1602-9.

Velazquez, E.R.; Matson, D.O.; Calva, J.J.; Guerrero, L.; Morrow, A.L.; Carter – Campbell, S.; Glass , R.I. ; Estes, M.K.; Pickering, I.k. and Ruiz-Palacios, G.M. (1996). Rotavirus infection infants protection against subsequent infection. N. Engl. J. med. 335(14): 1022-8.

Vesikari, T. (2009). Rotavirus vaccines. Scand. J. Infect. Dis. 40(9): 691-5.

Veskari, T ; Matson , D.O.; Dennehy , P.; *et al*. (2006). Safety and efficacy apentavalent human bovine (wC3) reassortment rotavirus vaccine. N. Engl. J. Med. 354(1): 23-33.

Ward, R.(2009). Mechanisms of protection against rotavirus infection and disease. Pediatr Infect Dis J. 28(3): 57-9.

Wible, J.D.; Yolken, R.; Willoughby, R. and Eiden, J. (1991). Improved detection of rotavirus sheeding by polymerase chain reaction. The Lancet. 337(8737): 323-326.

Widdowson, M.A.; Steele, D.; Vojdani, J.; Wecher, J. and Parashar, U.C. (2009). Global surveillance: determining the need and measuring the impact of rotavirus vaccines. J. Infect. Dis. 200: 5-8.

Xiaoli, L.P.; Bonita, L.; Nasim, B.; Barbara, L.; Jutta, K.; Preiksaitis, A. and Chariotte, C.Y. (2004). Increased detection of rotavirus using real time RT-PCR assay in stool specimens from children with diarrhea. Journal of Medical Virology. 72(3): 496-501.

Wood, A.C. and Lebaron, C.w. (2002). Rotavirus vaccine. N. Engl. J. Med. 72: 1455-62.

World Health Orgnization(WHO). (2010). Rotarix Vaccine. Laura J. Martin.

Xu, J.; Dennely, P.; Keyserling, H.; Westerman, L.E.; Wang, Y.; *et al*. (2005). Serum antibody responses in children with rotavirus diarrhea can serve as proxy for protection. Clin. Diag. Lab. Immunol. 12(2): 273-9.

Younis, D.A. (1989). Study on enteropathogenic and enterotoxigenic *E. coli* and Rotavirus isolated from children with diarrhea in Al-Musal City, M.Sc. thesis. Collage of science Al-Musal University.

Zarate, S.; Espinosa, R.; Romero, P.; Mendez, E.; Arias, C.F. and Lopez, S. (2000). The VP5 domain of VP4 can mediate of rotaviruses to cells. J. Virol. 74(2): 593-9.

Zárate, S.; Romero, P.; Espinosa, R.; Arias, C.F. and López, S. (2004). VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin alphavbeta3 through a novel integrin-binding site. J. Virol. 78(20): 10839-47.

Zeng, M.; Zhang, Y.; Zhu, Q.; Wang, X. and Yu, H. (2010). Clinical and molecular epidemiology of rotavirus in children with community-acquired and hospital-acquired diarrhea in Shanghai, China. Pediatr. Infect. Dis. 29(2):177-80.

2. Literature review

2.1. Diarrhea

Diarrheal illnesses in humans have been recognized since antiquity. Such illnesses continue to take a great toll of lives, with a disproportionately high mortality in infants and young children in developing countries. It has been estimated that 8.795 million deaths in children younger than 5 years worldwide occurred in 2008, infectious diseases caused 68%, and of these (15%) were attributable to diarrhea and 73% of these deaths were concentrated in developing countries constituting the second commonest cause of death due to infectious disease in children under five years old and a major cause of adult death in such countries (Black *et al*., 2010).

Three clinical syndromes of diarrhea have been defined, namely acute watery diarrhea, dysentery and persistent diarrhea, each reflecting different pathogenesis depending on the causative agents. Bacteriologic and parasitologic advances made during the past century led to the discovery of the etiology of some of the diarrheal illnesses (DuPont, 2009; El-Naggar *et al*., 2009). However, until 1973, no infectious agents could be identified in about 80% of patients admitted to hospital with severe dehydrating diarrhea. In 1973 Ruth Bishop, Geoffrey Davidson, Ian Holmes, and Brian Ruck identified abundant particles of a new virus (rotavirus) in the cytoplasm of mature epithelial cells lining duodenal villi and in feces, from such children admitted to the Royal Children's Hospital, Melbourne.

RVs have now been shown to cause 40-50% of severe acute diarrhea in young children worldwide in both developing and developed countries (Bishop, 2009).

2.2. Reoviruses

The genus rotavirus is belonging to *Reoviridae* Family. Reoviruses are medium sized measuring 70 - 85 nm in diameter and nearly spherical icosahedrons, non-enveloped, double protein capsid shell viruses with double - stranded RNA segmented genome. The family *Reoviridae* is divided into twelve genera, four genera are able to infect humans and animals; Orthoreovirus, Rotavirus, Coltivirus, and Orbivirus. There are at least 3 major subgroups and 9 serotypes of human rotaviruses (Brooks *et al*., 2007).

2.3. Structure of rotavirus

The term rotavirus which was derived from Latin word "Rota", means "wheel", It was suggested because of the sharply defined circular outline of the outer capsid giving the appearance of the rim of a wheel placed on short spokes radiating from a wide hub (Prasad and Chiu, 1994) figure (2.1).

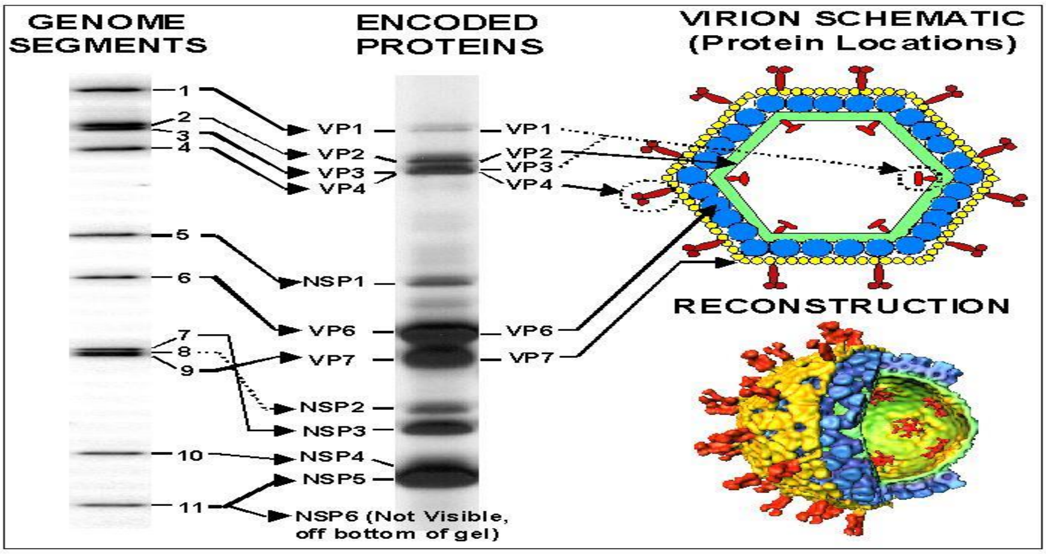


Figure (2.1) Rotavirus genomic segments and encoded proteins (Strauss and Strauss, 2008).

Rvs have a distinctive morphologic appearance as visualized by negatively stained electron microscopy; the complete viral particle is measuring 75 nm in diameter and has distinctive double-layered icosahedral protein capsid which consists of an outer and inner capsid, and a third layer within the inner capsid when viewed by transmission EM. The viral genome within the core consists of 11 segments of double-strand RNA. The complete particles are designated as smooth particles, because the outer most margin of the outer capsid layer has a well - defined smooth circular appearance. Particles lacking the outer capsid layer measure 55 nm in diameter are designated as rough particles that lacking the smooth outer layer. The capsomeres of the inner capsid project to the periphery, giving a circular, "bristly" appearance. The core, which appears to be hexagonal in outline in certain negatively stain preparations, measures 37 nm in diameter (Strauss and Strauss, 2008).Table (2.1).

Table (2.1): Genes and proteins of rotavirus (Strauss and Strauss, 2008)

RNA Segment (Gene)	Size (base pairs)	Protein	Molecular weight kDa	Location	Function
1	3302	VP1	125	At the vertices of the core	RNA-dependent RNA polymerase
2	2690	VP2	102	Forms inner shell of the core	Stimulates viral RNA replicase
3	2591	VP3	88	At the vertices of the core	Guanylyl transferase mRNA capping enzyme
4	2362	VP4	87	Surface spike	Cell attachment, virulence
5	1611	NSP1	59	Nonstructural	Not essential to virus growth
6	1356	VP6	45	Inner Capsid	Structural and species-specific antigen
7	1104	NSP3	37	Nonstructural	Enhances viral mRNA activity and shut-offs cellular protein synthesis
8	1059	NSP2	35	Nonstructural	NTPase involved in RNA packaging
9	1062	VP7[1] VP7[2]	38 and 34	Surface	Structural and neutralization antigen
10	751	NSP4	20	Nonstructural	Enterotoxin
11	667	NSP5 NSP6	22	Nonstructural	ssRNA and dsRNA binding modulator of NSP2

The RV genome comprises 11 double-strand RNA segments which are simply numbered from 1 to 11 in order of decreasing size that varies from 0.6 to 3.3 kilo base pairs (kbp). Each segment contains a single long open reading frame (ORF), with the exception of segments 9 and 11, each of which may contain two ORFs (Ramig, 1997). These code for 12 viral proteins; six were structural proteins (VP1-8, where VP4 is cleaved to produce VP5 and VP8) and six nonstructural proteins (NSP 1-6), which were numbered in order of decreasing size (Pesavento *et al*., 2006). The $5^{\backslash}$ and $3^{\backslash}$ ends of the RNA segments have non-coding regions that differ between RVs from groups A, B, and C. These sequences are important in transcription, replication, and reassortment of the virus genome (Mertens, 2004).

The virion is known as a triple-layered particle as the capsid has three layers, each is constructed from distinct virus structural protein. The inner and middle layers are constructed from VP2 and VP6 respectively, which are perforated by channels. The middle layer contains the spokes of the wheel and is the major component of the virion. The outer layer is constructed from the glycosylated VP7. Three outer protein species are found in the virion; VP1 and VP3 in the core, and VP4, which forms the spikes on the surface (Both *et al*., 1994). VP1 is located in the core of the virus particle and is an RNA polymerase enzyme. In an infected cell, this enzyme produces mRNA transcripts for the synthesis of viral proteins and produces copies of rotavirus genome RNA segments for newly produced virus particles (Vasquez-delcarpio *et al* ., 2006).

The VP2 forms the core layer of the virion and binds the RNA genome (Arnoldi *et al*., 2007). VP3 is part of the inner core of the virion and is an enzyme called guanylyl transferase which is a capping enzyme that catalyses the formation of the $5^{\backslash}$ cap in the post-transcriptional

modification of mRNA, the cap stabilizes viral mRNA by protecting it from nucleic acid degrading nuclease enzymes (Cook and McCrae, 2004). The VP4 is located on the surface of the virion that produces as a spike, which binds to receptor molecules on the surface of the host cell and drives the entry of virus inside the cell (Gardet *et al* ., 2006). Interestingly, VP4 can be modified by protease enzyme of the host gastrointestinal tract into VP5 and VP8 before the virus infection established, and determines the virulence of the virus and the P-type of the rotavirus (Hoshino *et al*., 2002). The VP6 forms the bulk of the capsid. It is highly antigenic and rotavirus species specific. Therefore, it is used in laboratory test to detect RV A infections (Gray and Iturriza-Gómara, 2011). VP7 is a glycoprotein that forms the outer surface of the virion. Apart from its structural functions, it determines the G-type of the strain and, along with VP4, is involved in immunity to infection (Pesavento *et al* ., 2006).

In addition to the viral structural proteins, there are six nonstructural proteins that are only produced in cells infected by RV (Taraporewala and Patton, 2004). NSP1, the product of gene 5, is a nonstructural RNA -binding protein while the NSP2 is an RNA-binding protein that accumulates in cytoplasmic inclusions (Viroplasms) and is required for genome replication (Ghosh *et al*., 2010). The NSP3 is bound to viral mRNAs in infected cell, and it is responsible for the shutdown of cellular protein synthesis (James *et al*., 1999).

The NSP4 is a viral enterotoxin that induce diarrhea and was the first viral enterotoxin discovered (Borghan *et al*., 2007). NSP5 is encoded by genome segment 11 of RV A and in virus-infected cells NSP5 accumulates in the viroplasm (Pesavento *et al*., 2006). The NSP6 is a nucleic acid binding protein , and is encoded by gene 11 from on out of phase open reading frame (Rainford and Mccrae, 2007).

2.4. Physicochemical Properties of rotavirus

The different RV particles possess distinct biophysical and biologic properties. Infectivity depends on the presence of the outer capsid layer, and treatments with calcium-chelating agents remove the outer capsid and result in a loss of infectivity (Strauss and Strauss, 2008). RV infectivity and particle integrity are generally resistant to fluorocarbon extraction and exposure to ether, chloroform, or deoxycholate reflecting the absence of an envelope on mature particles. Chloroform treatment reduces infectivity slightly and destroys hemagglutinating activity (Brooks *et al*., 2007). Sodium dodecyl sulfate (0.1%) inactivates infectivity, but exposure to nonionic detergents can enhance infectivity, presumably by disrupting aggregates (Abad *et al*., 1997).

RV infectivity is relatively stable to inactivation. Infectivity is stable within the pH range of 3 to 9, and virus samples from cattle and humans have retained infectivity for months at 4 ^{0}C or even 20 ^{0}C, when stabilized by 1.5 mM $CaCl_2$**.** The infectivity of bovine and simian RVs are relatively stable , even at 45^{0}C to 50 ^{0}C , but hemaagglutinating activity are destroyed by repeated freezing and thawing, and the hemagglutinating spikes are removed by treatment at high pH (Gray *et al*., 2008). The virus infectivity can be inactivated by disinfectants such as phenols, formalin, chlorine, and betapropiolactone. Ethanol (95%), perhaps the most effective disinfectant, exerts its effect by removing the outer capsid (Abad *et al*., 1994).

2.5. Antigenic composition of rotavirus

RVs have three important antigenic specificities; group, subgroup, and serotype which are determined by the viral capsid proteins. RVs have seven major groups (A - G). Humans are primarily infected by groups A, B and C, most commonly by group A. All seven groups cause disease in other

animals (Kirkwood, 2010**)**. Within rotavirus A there are different strains, called serotypes (Santos and Hoshino, 2005). A dual classification system is used, which is based on two structural proteins on the surface of the virion.

The glycoprotein VP7 defines G-types and the protease-sensitive protein VP4 defines P-types. Strains are generally designated by their G serotype specificities (e.g., serotypes G1 to G4 and G9), and the P-type is indicated by a number and a letter for the P-serotype and by a number in square brackets for the corresponding P-genotype. These genotypes correlate well with known P-serotypes (Dennehy, 2008). Because the two genes that determine G-types and P-types can be passed on separately to offspring, various combinations occur in any one strain (Desselberger *et al*., 2006**)**.

The product of the sixth gene of group A rotaviruses encodes VP6, the most abundant viral protein, which is the major determinant of group reactivity, and the target of common diagnostic assay, and contains the antigen used to further classify rotaviruses into subgroups I and II (Khamrin *et al*., 2009). The outer capsid glycoprotein, VP7, or G-protein (encoded by gene 7, 8 or 9, depending on the strain), and VP4, the protease -sensitive or P-protein (encoded by gene segment 4), determine the serotype specificity and form the basis of the binary classification (G and P type) of RVs. Both G and P proteins induce neutralizing antibodies and may be involved in protective immunity (Zarate *et al*., 2000).

2.6. Genetic diversity of rotavirus

RV is a double-stranded RNA virus that is characterized by substantial genetic diversity. Three mechanisms for generating genetic diversity have been identified; point mutation, genomic reassortment, and genome rearrangements (recombination) (Ramig, 1997). RVs have high

rate of mutation and it has been estimated that, on average, at least one mutation occurs during each genome replication (Kirkwood, 2010).

Reassortment genome segments also occur at high frequency during mixed infections which two or more RVs, both *in vitro* and *in vivo*. Natural reassortment *in vivo* appears to influence the serotypic diversity in humans, especially in less developed countries (O'Ryan, 2009).Recombination and related reassortments of viral RNA segments (e.g., partial gene duplication or deletions) probably play a minor role in generating viral diversity but may be important in longer-term viral evolution (Desselberger, 1996).

2.7. Classification of rotavirus

RV can be classified serologically into seven distinct groups named A to G. This classification is according to antigenic groups detectable by a number of serologic tests, such as immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and immunoelectron microscopy. The antigenic groups are mainly present on the major inner capsid protein VP6 (Estes, 2001). Groups A, B, and C RVs are found in both humans and animals, whereas viruses in groups D, E, F, and G have been found only in animals to date (Gray *et al*., 2008). Group A has been established as the predominant cause of human RV diarrheal disease. Group B is limited to epidemic infections in Asia and the Indian subcontinent, whereas group C RV causes endemic infections that frequently go unrecognized (Santos and Hoshino, 2005).

Within each group, RVs can be further classified into serotypes defined by reactivity of viruses in plaque reduction neutralization assays using polyclonal or monoclonal antisera specific for the viral capsid proteins VP7 and VP4 (Hoshino and Kapikian, 2000). In this way, serotype designation reflects the expression of neutralizing epitopes on VP4

(designated a P serotype because VP4 is protease sensitive) and VP7 (designated a G serotype because VP7 is a glycoprotein) (Coulson, 1996).

Serogroups can also be classified into genotypes by use of sequence analysis. Genotypes of VP4 and VP7 are determined by sequence or hybridization analysis, whereas serotypes are determined by reactivity with polyclonal or monoclonal antisera (Fischer and Gentsch, 2004). Currently, 15 G types have been described. G1, G2, G3, G4, and G9 constitute more than 92% of all G serotypes of humans detected globally and appear to be equally virulent (Santos and Hoshino, 2005). For VP7, a correlation between genotype and serotype has been established, but such correlation is less clear for VP4, (Gentsch *et al*., 1996). Therefore, a dual system P classification is in use (P genotypes numbers are denoted in brackets and P serotypes without brackets) (Taniguchi *et al*., 1987). At least 23 P genotypes P [1] – P [23] and 14 serotypes have been described. More than 91% of circulating human RV strains express the P [8] and P [4] genotypes. These genotypes correspond to two subtypes of P1 serotype (P1A and P1B, respectively) that share some cross- reactive epitopes (Coulson *et al*., 1987). Important features of RVs are that they can reassort (rearrange) their genes independently (Matthijnssens *et al*., 2009). Viruses within each group are capable of genetic reassortment, but reassortment does not occur among viruses in different groups (Desselberger, 1996).

2.8. Pathogenesis of rotavirus

RVs are a major cause of acute gastroenteritis of infants and young children worldwide. It is transmitted by the fecal-oral route, and possibly by the respiratory route. Only 10 to 100 infectious virus particles are needed to cause infection. This amount can readily be acquired through contact with contaminated hands and objects (Gray and Iturriza-Gomara, 2011). The watery diarrhea caused by RVs may be due to; malabsorption that occurs

secondary to the destruction of enterocytes, leading to a decrease in net fluid absorption, especially at young age at the time when the absorptive capacity of the colon is not yet fully developed; changes in the osmotic permeability of the mucosa secondary to destruction; and changes in fluid and electrolyte secretion. It has been found that RV decreases the activities of digestive enzymes at the apical brush border membrane and inhibits Na^+ -solute co transport systems. Accumulation of carbohydrates in the intestinal lumen as well as malabsorption of nutrients and a concomitant inhibition of water absorption can lead to a malabsorptive component of diarrhea (Lorrot and Vasseur, 2007).

RVs replicate mainly in the gut, and infect enterocytes of the villi of the small intestine, leading to structural and functional changes of the epithelium, making benefits of its triple protein coat that is resistant to acidic pH of the stomach and digestive enzymes in the gut (Greenberg and Estes, 2009). RV cell entry involves a series of complex and coordinated events that includes several interactions of the outer layer proteins of the virus with different cell surface molecules following proteolytic priming of the virus (Ruiz *et al.*, 2009). RV attach to the cell surface through interaction with sialic acid containing receptors, with integrins and heat shock cognate protein 70 (Hsc70) acting as post-attachment receptors (Isa *et al.*, 2006; Perez-Vargas *et al.*, 2006; Baker and Prasad, 2010). The proteins in the third layer (VP7 and VP4 spike) disrupt the membrane of the virus containing intracytoplasmic endosomes, creating a difference in the calcium concentration (Hyser *et al.*, 2010). This causes the breakdown of VP7 trimers into single protein subunits, leaving the VP2 and VP6 protein coats around the viral ds RNA, forming a double-layered particle (Trask *et al.*, 2010). The eleven ds-RNA strands remain within the protection of the two protein shells and the viral RNA-dependent RNA polymerase creates

mRNA transcripts of the ds-viral genome. By remaining in the core, the viral RNA evades innate host immune responses called RNA interference that are triggered by the presence of dsRNA (Liu *et al*., 2009).

During the infection, RV produces mRNA for both protein biosynthesis and gene replication. Most of the RV proteins accumulate in viroplasm, where the RNA is replicated and the double-layered particles are assembled. Viroplasm is formed around the cell nucleus as early as two hours after virus infection, and consists of viral factories thought to be made by two viral nonstructural proteins: NSP5 and NSP2. Inhibition of NSP5 by RNA interference results in a sharp decrease in RV replication. The double-layered particles migrate to the endoplasmic reticulum where they obtain third outer layer (formed by VP7 and VP4).

The progeny viruses are released from the cell by lysis (Jayaram *et al*., 2004). Large numbers of viruses are shed in feces, from 100 to 1000 particles per milliliter, so contamination of objects is relatively easy (Abad *et al*., 1994).

RV non-structural protein NSP4 can induce aqueous secretion in the gastrointestinal tract through activation of an age- and Ca^{+2}-dependent plasma membrane anion permeability (Lorrot and Vasseur, 2007; Hyser *et al*., 2010). NSP4 also induces nitric oxide synthase enzyme (NOS), an enzyme responsible for nitric oxide production. Accumulating evidence suggests that nitric oxide plays a role in the modulation of aqueous secretion and the barrier function of intestinal cells resulting in diarrhea (Borghan *et al*., 2007).

2.9. Pathology of rotavirus

After ingestion, the RV particles are carried to small intestine where they infect the mature enterocytes in the mid and upper part of the villi of the small intestine leading to diarrhea which can occur in the absence of histological changes in the intestine, and, conversely, the histological changes can be asymptomatic (Lynch *et al*., 2003). The structural abnormalities of the small intestine, including blunting of villi, increased crypt depth, flattening of epithelial cells, and an increase in inflammatory cells in the lamina propria. The severity of these changes is correlated with the severity of the resulting illness (Lorrot and Vasseur, 2007).

2.10. Clinical picture of rotavirus

RV gastroenteritis is a mild to severe disease characterized by vomiting, watery diarrhea, and low-grade fever. Once child is infecting by the virus, there is an incubation period of about two days before symptoms appear (Bernstein, 2009). Symptoms often start with vomiting followed by four to eight days of profuse diarrhea. Dehydration is more common in rotavirus infection than in most of those caused by bacterial pathogens, and is the most common cause of death related to RV infection (Parashar *et al*., 2006). RV infections can occur throughout life. Symptomatic infection rates are highest in children under two years of age and decrease progressively towards 45 years of age. RV infection in adults typically manifests with nausea, malaise, headache, abdominal cramping, diarrhea, and fever (Velázquez, 2009; Hasan *et al*., 2011b). Infection in newborn children, although common, is often associated with mild or asymptomatic disease. The most severe symptoms tend to occur in children from six months to two years of age, the elderly and immunocompromised patients (Anderson and Weber, 2004). Asymptomatic infections in adults may maintain the transmission of infection in the community (Liddle *et al*.,

1997).Symptomatic reinfections are often due to a different RV serotypes (Costa *et al*., 2004).

2.11. Immune response

RV replicates in the mature epithelial cells in the villi of the small intestine which seems to play an important role in the initiation of the host defense by releasing certain cytokine/chemochines that further trigger antigen-specific immunity by mediating both B and T cell responses (Frias *et al,* 2010). It has been suggested that RV escape from the intestinal tract resulting in antigenemia and possible viremia leading to generation of both systemic and mucosal responses (Malik *et al.,* 2008). Virus-specific antibody secreting B cell and memory B cells generated in the Peyer's patches enter the blood stream and traffic via homing receptors. Antibody secreting cells migrate and reside in the lamina properia and secrete monomeric IgA, which is eventually transported to the intestinal lumen, whereas memory B cells home to Peyer's patches (Blutt *et al*., 2004; Ward, 2009). The systemic viral antigen also stimulates formation of memory B cells and antibody secreting cells in the spleen, the antibody secreting cells home to bone marrow and secrete monomeric IgG and IgA which is the primary source of serum antibodies, whereas memory B cells circulate in blood and return to spleen (Pamela and Molyneaux, 1995). It has been documented that MHC class I restricted $CD8^+$ T cells play a major role in resolution of primary RV infection after primary infection, and mediate almost complete protection (up to 2 weeks) or partial protection (3 months) from reinfection; however, this protection diminished 8 months after primary infection (Jiang *et al*.,2008).

Early exposure to RV results in most severe episode of diarrhea and subsequent infections are milder or asymptomatic, with severity decreasing

as the number of reinfection increases, indicated that natural RV infection confers protection against subsequent infection that increases with each new infection and reduces the severity of the diarrhea (Fischer *et al*., 2002; Hirata *et al*., 2007; Velazuez, 2009). It is generally thought that the two outer capsid proteins VP4 and VP7 play a critical role in protective immunity by stimulating production of neutralizing antibodies (Malik *et al*., 2008). Both proteins induce neutralizing antibodies that can block enterocyte infection directly when present in lumen, anti-VP4 has been proposed to neutralize infectivity by inhibiting binding of virus to the cell, while anti-VP7 neutralize by inhibiting virus decapsidation (Ludert *et al*., 2002; Fleming *et al*., 2007; Ward, 2009).

Jiang *et al*. (2002) reported that in children with RV gastroenteritis or asymptomatic infection, preexisting levels of serum IgA, but not IgG correlate with protection as children with IgA responses develop less severe disease and less vomiting. Similarly, it has been reported that serum anti-rotavirus antibody, especially IgA, was a marker of protection against RV infection and moderate-to-severe diarrhea (Velázquez *et al*., 2000). However, in this regard, previous studies had obtained controversial results. In a previous study in Diyala-Iraq, the serum anti-RV IgG was detected in only 25.6% of diarrheic patients in whom RV was detected in their stool specimens (Hasan *et al*., 2011a). Nevertheless, among Spanish children with RV diarrhea, serum anti NSP4 (viral enterotoxin) IgG was detected in 70% of patients (Rodríguez-Díaz *et al*., 2005). Furthermore, it has been indicate that serum IgG is the most reliable marker for seroconversion and is a consistent proxy for protection against severe disease (Xu *et al*., 2005).

The presence of anti-RV IgA and neutralizing antibodies in colostrums and breast milk may be important in preventing infection or disease, or in preventing both infection and disease particularly in

developing countries in which these antibodies are highly prevalent (Chan *et al.,* 2011). Interestingly, it has been documented that mothers who breast-fed for six months or more tended to have higher milk neutralizing titers against RV (Bell *et al*., 1988). Controversially, it has been found that anti-RV antibodies are only partly responsible for the neutralizing activity detected in milk, suggesting that other components possessing suppressive activity against rotavirus must also be present (Asensi *et al*., 2006). However, It has been confirmed experimentally that administration of anti-NSP4 antibody is effective both prior to and during the time course of RV infection (Hou *et al*., 2008). Furthermore, it has been shown that donor breast milk saved infant lives during an outbreak of RV in South Africa (Rinaldi *et al*., 2009). In Iraq, therefore, it was found that breast-fed infants are significantly less susceptible to RV disease than bottle-fed infants during the first few months of life (Hasan *et al*., 2011b).

The highest incidence of RV gastroenteritis has generally been reported in children 6-24 months of age. Young infants are thought to be partially protected by maternal antibodies acquired transplacentally or via breast milk. It has been reported that fewer RV infections occur when cord blood contains higher level of IgG antibodies, suggesting a role of protective immunity (Ray *et al*., 2007). Furthermore, low titers of anti-RV neutralizing antibodies among the mothers predispose the children to infection by RV (Ray and Kelkar, 2009).

2.12. Diagnosis of rotavirus

Initial efforts to isolate wild-type in tissue culture were not very successful. For this reason, early clinical studies characterized RVs by isolating viral RNA from feces and then analyzing the RNA by electrophoresis in polyacrylamide gels. Using this method, RVs were classified depending on the pattern of migration of their RNA segments

(electropherotypes) (Kasempimolporn *et al.*, 1988). At present, this method seems of limited value because relationships between electropherotypes and virulence or serotypes are not generally apparent. Direct visualization of stool material by electron microscopy (EM) was employed for RV detection when one or few specimens are to be examined (de Beer *et al.*, 1997). EM is a rapid diagnostic method because fecal specimen can be stained with phosphotungstic acid and examined directly within a few minutes of collection (Arcangeletti *et al.*, 2005).

Currently, laboratory diagnosis of RV infection is usually performed by antigen detection, using enzyme immunoassay or latex agglutination (LA) techniques, which have a sensitivity and specificity above 90%.

Molecular techniques such as polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) are used to determine the RNA migration patterns and virus genotyping, respectively (Vainio *et al.*, 2009).

2.12.1. Rapid agglutination test

Rapid detection of RV antigen is one of the techniques that used for detection of RV in stool specimens by agglutinated antigens with antibodies. The test is qualitative and it is a good tool for the simple and rapid detection of RV in stool specimens (Al-Yousif *et al.*, 2001). It has been found that the latex agglutination test sensitivity was 98.2% and the specificity was 94.8% (Kohno *et al.*, 2000). Among 300 patients with acute diarrhea in Diyala-Iraq, the overall infection by RV as detected by latex agglutination test was 20.3% and the highest infection rate was among those less than 5 years old (Hasan *et al.*, 2011b). In Mekka-Saudi Arabia 10% of patients were positive for RV detected by latex agglutination test in stool specimens (Ghazi *et al.*, 2005). In 293 stool samples collected

from hospitalized Brazilian children, RV was detected in 34.8% of samples by latex agglutination assay with a sensitivity, specificity, and accuracy were 82.6%, 81.6% and 81.9%, respectively (Pereira *et al.*, 2011).

2.12.2. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)

Enzyme-linked immunosorbent Assays (ELISA) is an immunoassay for detection of serum anti-RV antibodies or RV antigen in feces. RV is shed in very large amounts making the ELISA a highly beneficial, sensitive and accurate diagnostic assay (Fischer and Gentsch, 2004). Using ELISA technique for detection of RV in stool specimens among children followed for 2 years revealed that ELISA is a reliable monitoring tool for the diagnosis of RV infection (Fischer *et al*., 2002). ELISA technique was also used to evaluate the maternal serum and breast milk antibodies to RV to predict the impact of maternal anti-RV serum and breast milk antibody upon vaccine immunogenicity (Chan *et al*., 2011). In another study, RV was detected in (56%) of stool specimens collected from 200 Mexican children less than 2 years of age, while serum anti-RV IgA and IgG were detected in 77% of them (Velazquez *et al*., 1996). In Norway, 63% of hospitalized children with acute gastroenteritis were stool positive for RV infection by ELISA technique (Vainio *et al*., 2009).

Ghazi *et al*. (2005) in their population- based study on randomly selected infants and young children with acute diarrhea in Mekka-Saudi Arabia, RV was detected in 95.8% of stool specimens by ELISA technique. In another study in Gizan, RV was detected in 12% of patients with acute diarrhea, and the highest infection rate was among those 48-59 months (Kheyami *et al.*, 2008). In Al-Karak-Jordan, the RV was detected in 39.9% of stool specimens of hospitalized children below 5 years of age, predominantly in the age group less than 2 years (Nafi, 2010). Among hospitalized children less than 3 years of age with acute diarrhea in New

Zealand, the ELISA positivity rate was 42.6%, and the infection rate was significantly higher in the age 12-35 months (52.1%), and during winter/spring seasons (Grimwood *et al*., 2006). In a hospital-based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis among European children younger than 5 years of age including 12 hospitals in France, Germany, Italy, Spain, and the United Kingdom, 43.4% were RV positive by ELISA, 80.9% of them occurred in children less than 2 years (Forster *et al*., 2009). In countries of the Eastern Mediterranean region, and out of 63 published studies among patients with diarrhea, RV was detected in 40% of inpatients and 23% of outpatients and by 3 years of age, 75% of children experienced a documented RV infection (Malek *et al*., 2010). Additionally, RV were detected in faeces of 13.8% children with acute diarrhea, 90.9% of positive cases of RV gastroenteritis were under 2 years of age with highest prevalence in children 7-12 months of age (Junaid *et al*., 2011). Among 293 stool samples collected from Brazilian patients hospitalized due to gastroenteritis, 28.3% of samples were positive by EIA assay with sensitivity, specificity and accuracy were 94.6%, 94.4% and 94.5% respectively (Pereira *et al*., 2011).

Hasan *et al*. (2011a) reported that serum anti-RV IgG was found among 49.3% of patients with acute diarrhea compared to 37.1% in healthy controls as detected by ELISA, and that 50.4% of those below 5 years of age had IgG in their sera.

2.12.3. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

It is a variant of PCR, a laboratory technique commonly used in molecular biology to generate many copies of a nucleic acid sequence, a process termed " amplification . In RT-PCR , however , an RNA strand is first reverse transcribed into its DNA complement (complementary DNA, or cDNA) using the enzyme reverse transcriptase, and the resulting cDNA is amplified using traditional or real-time PCR (Fischer and Gentsch, 2004).

In a comparative study using an enzyme-linked immunosorbent assay,

an immunochromatographic test and RT-PCR for detection of RV in stool specimens of children <5 years of age admitted to hospital with diarrhea, the detection rate was 63%, 58%, and 72% respectively (Vaienio *et al*., 2009).

2.13. Traditional versus molecular techniques

Comparing PCR with EM, latex agglutination and EIA techniques, it is the most sensitive methods for identifying group A RV. EIA has the advantage of being relatively quick, while PCR allows scientists to sequence nucleotides, which can be useful in studying the molecular epidemiology of the virus. EM is also relatively quick, and can be used to identify non-group A viruses; however access to EM is not usually available in developing nation (Arcangeletti *et al*., 2005).

Park *et al*. (2011) using RT-PCR for genotyping RV in ELISA positive stool specimens, reported that G and P genotypes were determined in 90% and 93% of specimens, and 25 were G-P combination. The enzyme immunosorbent assay (ELISA) is an effective method for detecting rotavirus- specific antibodies, especially in current or recently acquired infections. High levels of RV – specific IgM and IgA were present in patients stools one day after the onset of disease, and remained so for about ten days, even after virus shedding was no longer observed. While ELISA is a sensitive means of detection, it is not a reasonable method after day 10 post infection when antibody levels in the stool drop.

ELISA has several advantages. It can be performed in-horse without previous treatment of the sample, and it costs less than RT-PCR (Montykrieger *et al*., 2004). ELISA was found to be as effective as RT-PCR, which is generally considered the standard in virus detection. It was estimated that ELISA required 10^6 RV particles per milliliter, RT-PCR required 10^4, and PAGE required 10^{11} RV particles. Thus, there are several methods a available for the detection and diagnosis of rotavirus. RT-PCR is generally considered the gold standard in detection, but ELISA, EIA, and EM provide sufficiently sensitive alter natives (Jarasvech *et al*.,1993).

The Hybridization assay for detection of rotaviruses has been developed based on in situ hybridization of labeled rotavirus ssRNA

transcripts to heat-denaturized rotavirus RNA immobilized on a nitrocellulose membrane (Rosai and Akerma , 2004).

2.14. Epidemiology:

RV is a common childhood diarrheal illness, with 95% of children ages 3-5 having already contracted the virus. It causes 1/3 of diarrhea associated deaths and kills more than 873,000 children worldwide (Frieden *et al*., 2011; Black *et al*., 2010). It is estimated that about 40% of all hospital admissions due to diarrhea among children fewer than five years of age worldwide are due to RV infection (WHO, 2010). The huge numbers of infected individuals stem from the fact that 10^{10} particles per gram of feces are shed for 3-7 days in normal individuals. RV is highly infectious and a dose of less than 100 particles is enough to lead to infection and cause disease (Bernstein, 2009).

RV appears to be transmitted by the fecal-oral route and possibly by other routes (Kapikian *et al*., 2001). The source of infection for the young infant and children from environmental contamination that include: the persistence of RV infection in certain newborn nurseries and the high frequency of nosocomial RV infection in hospitals, as well as waterborne epidemics, as RVs are resistant to chlorination (Ashbolt, 2004; Chandran *et al*., 2006). The ability of RVs to survive on various surfaces under different conditions may contribute to the rapid spread of these agents. However, high relative humidity (~ 80%) results in a rapid loss of human RV infectivity (Gray *et al*., 2008). Effective disinfection of contaminated material and careful hand-washing constitute important measure to contain RV infection, especially in a hospital or constitutional setting (Samal *et al*., 1996). The virus tends to peak in winter and fall in temperate climates; it seems that RV responds to changes in climate in the tropics, with the highest number of infections found at the colder and drier times of the year (Levy *et al*., 2009).

Among patients with diarrhea in Eastern Mediterranean Region, RV was detected in 40% of in-patients and 23% of out-patients 3 years of age, 75% of children experienced a documented RV infection (Malek *et al*., 2010). In a study in Iran, of 2198 children admitted to the hospital for acute gastroenteritis, 59.1% had stool samples test positive for RV, 85% occurred during the first 2 years of life, with the peak prevalence of severe RV disease occurring from September through January and G4P [8] was the most commonly detected RV genotype (Eesteghamati *et al* ., 2009).

In Saudi Arabia, One thousand samples were obtained from children (aged 6 years or less) presenting with community acquired diarrhea, RV was identified in 6% of the specimens and RV G9 was characterized for the first time in Saudi Arabia (Tayeb *et al*., 2010). However, the prevalence of RV infection ranged from 10% to 46% and most cases were among children less than 2 years of age, particularly in the first year of life, with increased infection during winter in some cities and during summer in others. G1 was the predominant serotype followed by G4, G3 and G2 (Kheyami *et al*., 2006). In Jordan, among children aged under 5 years admitted to hospital with diarrhea. 39.9% were positive for RV infection, predominantly in the age group < 2 years and the lowest rate of infection was winter (Nafi, 2010). In another study, RV genotypes P[8],G1 (56%), P[4],G2 (14%) and P[8],G9 (13%) were most commonly identified (Kaplan *et al*., 2011). In Tunisian children with acute gastroenteritis, RV was detected in 27% of samples, and the infection rate was significantly higher among inpatients (29%) than among outpatients (13%) with a winter peak (Sdiri-Loulizi *et al*., 2011). In Turkey, RV infection was detected in 52.7 % of the patients, and group A rotavirus was the causative agent of the epidemic (Koroglu *et al*., 2011).

In Iraq, several studies had been carried out for detection of RV; the rate of infection by RV in Baghdad was 40.2 % among children under 3 years (Abas *et al*., 1988). In another study in Basrah, the rate of infection was 11.48 % among children under 5 years (Al-kerwi *et al*., 1993). However, in Diyala province, the infection rate was 20.3% and it was highest among those less than 5 years old (Hasan *et al*., 2011 b).

In a study conducted in the United States before initiation of the RV vaccination program, over 2.7 million cases of RV gastroenteritis occurred annually. 60,000 children were hospitalized and around 37 died (Fischer *et al*., 2007). In a hospital-based study in China among children >28 days of age, RV infection was related to 37.2% of outpatients and 48.1% of inpatients, and RV was responsible for 54.8% of nosocomial diarrhea and that G3P[8] was the most prevalent, followed by G1P[8], G2P[4], and G9P[8] (Zeng *et al*., 2010). In India, one of every 250 children dies of RV diarrhea each year. The prevalence has been found to vary from 5-71% in hospitalized children <5 yr of age with acute gastroenteritis, with high incidence in winter months at low relative humidity, and the most common G types reported were G1, G2 and G9, and P types were P[4] and P[8] (Broor *et al*., 2003).

A prospective study was conducted in 12 hospitals in France, Germany, Italy, Spain, and the United Kingdom among children less than 5 years old with community-acquired acute gastroenteritis, 43.4% were RV-positive and 80.9% occurred in children aged <2 years. The rotavirus-positive strains were genotyped G1P[8], G9P[8], G4P[8] and G3P[8] (Forster *et al*., 2009) Among hospitalized Children under 3 years of age with acute diarrhea in New Zealand, 42.6% were positive for RV infection and the highest rate among those 12-35 months (Grimwood *et al*., 2006). In Nigeria, The incidence of RV infection among hospitalized children with gastroenteritis was 13.8% (Junaid *et al*., 2011).

Seven groups of rotaviruses are recognized; A, B, C, D, E, F, and G. Three groups infect humans, group A rotavirus which accounts for more than 90% of rotavirus gastroenteritis in humans, is endemic worldwide (Leung *et al.*, 2005). According to the World Health Organization, the most common RV strains found were G1, G2, G3, G4, and G9, and the distribution of strains varied markedly across regions (CDC, 2008).

Outbreaks of rotavirus A diarrhea are common among hospitalized infants, young children attending day care centers, and elderly people in nursing homes (Frieden *et al.*, 2011). During 2005, the largest outbreak was recorded in Nicaragua which was found to be associated with mutations in the rotavirus A genome, possibly helping the virus escape the prevalent immunity in the population (Bucardo *et al* ., 2007). RV group B, also called adult diarrhea has caused major epidemics of severe diarrhea effecting thousands of people of all ages in china and India (Kelkar and Zade, 2004). RV C has been associated with rare and sporadic cases of diarrhea in children in among countries, and outbreaks have occurred in Japan and England (kuzuya *et al.*, 2007).

2.15. Prevention and Control

2.15.1. Treatment

RV diarrhea is self-limited and treatment is aimed at reducing symptoms until the immune response resolves the infection (Diggle, 2007).

Children with mild diarrhea are treated by oral rehydration for replacement of fluids and electrolytes lost by vomiting and diarrhea.

Intravenous fluid administration has been used successfully for many years in treating dehydration from diarrhea. Because facilities for parenteral

administration of fluids and electrolytes may not readily available in many parts of the world, intensive efforts have been made to evaluate the efficacy of oral fluid replacement therapy (Alam and Ashraf, 2003). In cases of severe disease, treatment with probiotics, a preparations that contain antibodies against RV (Grandy *et al*.,2010; Guandalini, 2011).

2.15.2. Vaccination

Observations made during epidemiology and hospital – based studies throughout the world clearly indicate the need for prevention of rotavirus disease. The aim of a rotavirus vaccine targets to prevent severe rotavirus gastroenteritis during the first two years of life, the period when rotavirus disease is most serious (Bernsten, 2009). The first commercially available RV vaccine in 1998 was a simian- human reassortment to trivalent vaccine (Rota shield). Although this vaccine was highly effective, it was withdrawn from the marker one year after its introduction due to its temporal association with low levels of intussusceptions in children (Wood and Lebanon, 2002).

In 2006, two new rotavirus vaccines have been licensed for use in many countries world-wide. These vaccines appear to be safe and do not cause intussusceptions. The vaccine produced by Merck (Rota Teq) contains mono-reassortments of bovine virus with G1, G2, G3, G4, and P1A human RV genes (Matson, 2006). The vaccine produced by Gaxo Smith Kline (GSK, Rota rix) is a human-attenuated G1P [8] virus (O˜Ryan, 2007). In trial that involved over 60.000 infants, both of these vaccines have been shown to be safe and to provide over 70% protection against any RV diarrhea and over 98% protection against severe RV infection (Ruzi-Palacios *et al* ., 2006). Importantly, both vaccines reduced the rates of all gastroenteritis –related hospitalizations of any cases by over 40%. Despite these encouraging results, it is still undetermined whether these vaccines

work in very poor developing countries in Africa and Asia in which children can be malnourished and in which a typical RV strains may circulate frequently (Widdowson *et al*., 2009).Moreover, the intussusceptions associated with Rota shield was predominantly seen in children older than 2 months, and the children studied in the safety evaluation of the two new vaccines were mostly 2 months age. Thus, safety of the new RV vaccines in children of more than 2 months of age has not been fully established the development of second-generation vaccines may be desirable (CDC, 2009). A promising strategy to drastically reduce the risk of intussusceptions is to administer the vaccine to neonates, in whom intussusceptions almost never occurs (Vesikari *et al* ., 2006).

2.16. Zoonotic aspects of rotavirus

RVs are generally species-specific, but cross-species transmission is possible, causing economically significant malady in neonates of many domestic animals (Cook *et al*., 2004; Dhama *et al*., 2009). Rotaviruses infect and cause diarrhea in the young of many species of animals including mammals (apes, cattle, pigs, sheep, rats, cats and dogs, mice, horses, rabbits) and birds (chickens and turkeys) (Brooks, *et al*., 2007; Martella *et al*., 2010). There is increasing evidence that animal RVs can infect humans, either by direct transmission of the virus or by contributing one or several genes to reassortants with essentially a human strain genetic background, as mixed infections are a prerequisite for reassortment events (Gentsch *et al*., 2005; Muller and Johne, 2007).

Steyer *et al*.(2008),In a study in Slovenia to determine the incidence of asymptomatic RV infection in animals using RT-PCR technique, the rates of asymptomatic shedding of RVs in pigs and cattle were 18.0 % and 4.0 % respectively and evidence for zoonotic transmission was detected in one human RV strain. Among neonatal calves bovine group A rotavirus

was detected in fecal samples of (15%) by ELISA (Lucchelli *et al*., 1992). In Switzerland, among fecal specimens from 147 untreated calves suffering from acute diarrhea, the prevalence of RV was 58.7% (Uhde *et al*., 2008). By ELISA and RNA polyacrylamide gel electrophoresis, group A rotavirus was detected in (43.8%) of the fecal specimens from scouring calves and (3.7%) of the samples from non-scouring calves (de Verdier Klingenberg and Svensson, 1998).

In Spain, the prevalence of group A RV infection in diarrheic lambs was very low (2.1%), while groups A and B RVs were detected in three (8.1%) and five (13.5%) diarrheic goat kids. Group C RVs were detected in four non-diarrheic goat kids. An association of diarrhea and infection was demonstrated only for group B RV (Munoz *et al*., 1996). In another study, fecal specimens from diarrheic and non-diarrheic calves, piglets, lambs and goat kids were collected and screened by a latex agglutination test to detect the presence of group A RV antigen. Of a total of 470 animals screened, (29.4%) had fecal specimens positive for RV. The prevalence of infection was 27.7% in calves, 27.8% in piglets, 48.6% in lambs and 28.6% in goat kids (Kaminjolo and Adesiyun, 1994). In Bangladesh, fecal specimens from 434 calves (307 diarrheal and 127 normal) were collected and tested by ELISA to detect the presence of RV antigen. Of these (7.0%) were positive, of which (7.2%) were from diarrheic calves and (6.3%) from non-diarrheic calves (Selim *et al*., 1991).Ultimately, it has been affirmed through complete genome sequencing that a common evolutionary origin of bovine, ovine, antelope, guanaco and human rotavirus (Ghosh *et al*., 2010).

Summary

The present study was conducted for the period from 1/August/2010 to 30/August /2011 in Baquba city. The study aimed to explore the diagnostic capability of different laboratory techniques namely; rapid latex agglutination test, enzyme-linked immunosorbant assay, and polymerase chain reaction for the detection of rotavirus in stool specimens of human and certain domestic animal species and also explore the effects of certain demographic factors on the detection rates by these laboratory techniques.

The study included 120 patients with acute diarrhea, 70 were male and 50 were female. The age ranged from two months to 5 years. Demographic information on the patients regarding age, sex, residence, type of feeding and source of drinking water were collected from their parents. Additionally, 60 apparently healthy domestic animals were included. Stool specimens were collected from each patients and domestic animals. Detection of rotavirus in stool specimens was done by direct agglutination test (DAT), Enzyme-liked immunosorbant assay (ELISA) and conventional reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The ELISA technique was carried out in the Virology Unit/Public Health Laboratory in Baquba, while the RT-PCR was carried out in Virology Laboratory/College of Veterinary Medicine- Diyala University.

The results of the present study showed that the overall infection rate by rotavirus among patients with acute diarrhea by DAT, ELISA and RT-PCR tests was 70%, 93.33% and 93.88% respectively. The highest infection rate was recorded among those >10-≤15 months of

age by the three diagnostics tests. None of the three techniques showed significantly difference between female and male, DAT (72% *vs* 68.57%), ELISA (96% *vs* 91.42%), and PCR (88% *vs* 96.87%). Likewise, there was insignificantly difference between urban and rural residence, DAT (70.31% *vs* 69.64%), ELISA (95.31% *vs* 97.07%), and PCR (95.65% *vs* 92.30%).

The results revealed insignificantly higher infection rate among patients (those below 2 years) feed mixing (80.55%, 97.22% and 91.66%) respectively and bottled (69.49%, 94.91% and 100%) respectively compared to that breast feeding (73.33%, 86.66% and 77.77%) respectively by three techniques (DAT, ELISA and RT-PCR).

The rotavirus infection rate was insignificantly higher among patients consuming municipal water for drinking (80.95%, 94.68% and 97.22%) compared to those consuming bottled water (72.22%, 88.46% and 84.61%) respectively by the three techniques (DAT, ELISA and RT-PCR).

The sensitivity and specificity of DAT and ELISA tests compared to RT-PCR test in detecting of RV in human stool specimens were 75.56% and 66.67% for the DAT test, whereas, 91.3% and 66.67% for ELISA test.

The results of RT-PCR test showed that the rotavirus detection rate in stool specimens of healthy domestic animals was 76.92%.

The study concluded that rotavirus was detected in high rates among children less than 5 years old with acute diarrhea in Baquba city, particularly those who were less than 2 year old. Furthermore, the detection rate by ELISA was almost unique to that of conventional

RT-PCR, suggesting that ELISA is the most appropriate method with excellent sensitivity and specificity for detection of RV in stool specimens in a setting like that in Baqupa city. Additionally, the farm domestic animals were suggested to be a remarkable source of infection by rotavirus in the community.

List of contents

	Contents	Page
	Supervisor certification	
	Certification	
	Dedication	
	Acknowledgments	
	Summary	I
	List of Contents	IV
	List of Tables	VII
	List of Figures	IX
	List of Abbreviations	X
Chapter one: Introduction		
1.	Introduction	1
	Aims of the study	4
Chapter two: Literature Review		
2.1.	Diarrhea	5
2.2.	Reoviruses	6
2.3.	Structure of rotavirus	6
2.4.	Physiochemical properties of rotavirus	11
2.5.	Antigenic composition of rotavirus	11
2.6.	Genetic diversity of rotavirus	12
2.7.	Classification of rotavirus	13
2.8.	Pathogenesis of rotavirus	14
2.9.	Pathology of rotavirus	17
2.10.	Clinical picture of rotavirus	17
2.11.	Immune response	18
2.12.	Diagnosis of rotavirus	20
2.12.1.	Rapid agglutination test	21
2.12.2.	Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)	22
2.12.3.	Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)	23
2.13.	Traditional versus molecular techniques	24
2.14.	Epidemiology	25
2.15	Prevention and Control	28
2.15.1.	Treatment	28
2.15.2.	Vaccination	29
2.16.	Zoonostic aspects of rotavirus	30

Chapter three: Materials and Methods		
3.1.	Materials	32
3.1.1.	Laboratory equipments and instruments	32
3.1.2.	Chemicals	32
3.1.3.	Laboratory diagnostic kits	33
3.2.	Methods	33
3.2.1.	Preparation of solutions	33
3.2.1.1.	Sodium hydroxide solution	33
3.2.1.2.	Hydrochloric acid solution	34
3.2.1.3.	Phosphate buffer saline	34
3.2.1.4.	Running buffer	34
3.2.1.5.	Ethidium bromide stain	34
3.2.1.6.	Agarose gel	34
3.2.2.	Study groups	34
3.2.3.	Collection of stool specimens	35
3.2.4.	Detection of rotavirus	36
3.2.4.1.	Direct agglutination test	36
3.2.4.1.1.	Test principle	36
3.2.4.1.2.	Test procedure	36
3.2.4.1.3.	Interpretation of results	37
3.2.4.2.	Rotavirus Ag (stool) ELISA test	37
3.2.4.2.1.	Test principle	37
3.2.4.2.2.	Test procedure	37
3.2.4.2.3.	Interpretation of results	38
3.2.4.3.	Molecular detection of rotavirus	38
3.2.4.3.1.	RNA extraction	38
3.2.4.3.1.1.	Preparation of solutions	38
3.2.4.3.1.2.	RNA extraction procedure	39
3.2.4.3.2.	RT-PCR test	40
3.2.4.3.2.1.	Test principle	40
3.2.4.3.2.2.	Test procedure	41
3.2.4.3.2.3.	Interpretation of results	42
3.2.4.3.3.	Procedure of agarose gel electrophoresis	42
3.2.5.	Statistical analysis	43
Chapter four: Results and Discussion		
4.1.	Results	45
4.1.1.	Study groups	45
4.1.1.1.	Human patients	45
4.1.1.2.	Animal group	47

4.1.2.	Detection of rotavirus in human	47
4.1.2.1.	Direct agglutination test	47
4.1.2.2.	Enzyme-linked immunosorbant assay	47
4.1.2.3.	Polymerase chain reaction	47
4.1.2.4.	Sensitivity and specificity	48
4.1.2.5.	Detection rate by different techniques	49
4.1.3.	Effects of certain factors on DAT results	49
4.1.4.	Effects of certain factors on ELISA results	53
4.1.5.	Effects of certain factors on RT-PCR results	56
4.1.6.	Results of different techniques in animal specimen	60
4.2	Discussion	60
4.2.1.	Detection of rotavirus in human	60
4.2.1.1.	Direct agglutination test	60
4.2.1.2.	Enzyme-linked immunosorbent assay	61
4.2.1.3.	Polymerase chain reaction	61
4.2.1.4.	Sensitivity and specificity	61
4.2.1.5.	Detection rate by different techniques	62
4.2.2.	Effects of certain factors on DAT, ELISA, and RT-PCR results	63
4.2.2.1.	Age:	63
4.2.2.2.	Gender	64
4.2.2.3.	Residence	64
4.2.2.4.	Type of feeding	64
4.2.2.5.	Source of drinking water	65
4.2.3.	Spearman correlation between DAT, ELISA, and RT-PCR tests and different parameters	65
4.2.4.	Results of different techniques in animal specimen	65
Conclusions and Recommendations		
	Conclusions	67
	Recommendations	68
	References	69
Appendices		
الخلاصة		

List of Tables

	Addresses	Page
2.1	Genes and proteins of rotavirus	8
3.1	Equipments and instruments used in the study	32
3.2	Chemical materials used in the study	33
3.3	Laboratory diagnostic kits used in the study	33
4.1	Descriptive table for variables in human patient (n=120)	46
4.2	Results of DAT test for human stool specimens	47
4.3	Results of ELISA technique for human stool specimens	47
4.4	Results of PCR technique for human stool specimens	48
4.5	Sensitivity and specificity of DAT test and ELISA test in detection Rota virus in human patients	49
4.6	Rotavirus detection rate by the three techniques	49
4.7	Distribution of DAT results according to age	50
4.8	Distribution of DAT results according to sex	50
4.9	Distribution of DAT results according to residence	51
4.10	Distribution of DAT results according to type of feeding (n=110)	51
4.11	Distribution of DAT results according to source of drinking water	52
4.12	Spearman correlation between DAT test and different parameters in 120 human patients	52
4.13	Distribution of ELISA results according to age	53
4.14	Distribution of ELISA results according to sex	54
4.15	Distribution of ELISA results according to residence	54
4.16	Distribution of ELISA results according to type of feeding (n=110)	55
4.17	Distribution of ELISA results according to source of drinking water	55
4.18	Spearman correlation between ELISA test and different parameters in 120 human patients	56
4.19	Distribution of PCR results according to age	57
4.20	Distribution of PCR results according to sex	57
4.21	Distribution of PCR results according to residence	58
4.22	Distribution of PCR results according to type of feeding n=110	58
4.23	Distribution of PCR results according to source of drinking water	59

4.24	Spearman correlation between PCR test and different parameters in 49 human patients	59
4.25	Result of DAT,ELISA and PCR test for animal specimens (n=60)	60

List of Figures

	Addresses	Page
2.1	Rotavirus genomic segments and encoded proteins	6
4.1	Results of gel electrophoreses for human stool specimens	48

List of Abbreviations

DAT	Direct agglutination test
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay
EIA	Enzyme Immune Assay
EM	Electron microscope
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
NSP	Non structural protien
OD	Optical density
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
RT-PCR	Reverse transcriptase- Polymerase chain reaction
RV	Rotavirus
VP	Virus protien