التحري عن وجود فيروس الادينو في عينات مياه مأخوذة من مصادر مختلفة في محافظة بابل باستخدام تقنيةnested – PCR

حوراء جواد كاظم

كلية العلوم للبنات / جامعة بابل

mobalqaswar@yahoo.com

الملخص :

اجريت هذه الدراسة للكشف عن فيروس الادينو في عينات مياه مأخوذة من مصادر مختلفة في محافظة بابل . جمعت خلال هذه الفترة٨٠ عينة ماء من اماكن مختلفة من شط الحلة وعدد من البزول الموجودة في مركز المدينة ، ناحية الهاشمية وقضاء المحاويل ، اذ تم الكشف عن (٤٣) عينة كانت موجبة لفحص الكاسيت (الشريط السريع) من اصل (٨٠) عينة وبنسبة (٥٣,٧٥%)، اما نتائج فحص حساسية وخصوصية فحص الكاسيت (الشريط السريع) فقد كانت (٧٩,٦ و ٧٧،٠٨)على التوالي ،اظهر فحص ال PCR نسبة (٤٠%) نتيجة موجبة .

كلمات مفتاحية : فيروس الادينو ، مياه الانهار والبزول ، فحص الشريط السريع ، فحص تفاعل البلمرة المتسلسل

DETECTION OF ADENO VIRUS IN WATER SAMPLES COLLECTED FROM VARIOUS SOURCES OF BABYLON PROVICE BY USING NESTED – PCR

Hawraa Jawad Kadhim

Coll. of scien. for women/ Univ of Babylon

mobalqaswar@yahoo.com

ABSTRACT

This study was carried out for detection of Adevo virus from water samples collected from various sources in Babylon provice , during this period , 80 water samples were collected from various locations in Hilla river and a number of crops in the city center , Hashimiya and Mahaweel districts . A tatal of (43) samples were found to be positive for cassette (Rapid test) out of (80) samples with percentage (53.75%) , and the result of sensitivity and

specificity of cassette (Rapid test) were (79.6 , 77.08) respectively , while PCR test showed (40%) positive result .

Keyword : Adeno virus , water river and streams , Rapid stripe test , PCR test

المقدمة :

يعد فيروس الادينو " Adevo virus" من مسببات الأمراض البشرية الهامة التي تسبب مجموعة متنوعة من الأمراض للانسان بدءا من أمراض الجهاز التنفسي ومرض التهاب الملتحمة والتهاب المعدة والأمعاء (8,14,9). تحدث الاصابة بفيروس الادينو عن طريق شرب المياه الملوثة بالفيروس أو استنشاق الرذاذ الملوث بالفيروس من مياه احواض السباحه ، تكون الاصابة بفيروس الادينو شائعة نسبيا وان ٨٠٪ من حالات الاصابة بالفيروس تؤدي الى افراز الفيروس لفترات طويلة في ادرار او براز الأشخاص المصابين (22) . يفرز الفيروس في البراز البشري ، لذلك سيكون متوفر بكميات وفيرة جدا في مياه الصرف الصحي والمياه الملوثة (5,15,7) .وجد ان اكثر الفيروسات المتواجدة في عينات مياه الانهار الملوثة بالبراز هي فيروسات الادينو (٦٥%) تليها فيروسات التهاب الكبد نوع (A) (٤٣%) ثم مجموعة الفيروسات المعوية (٢٢%) (18) .اما الباحث Haramoto وجماعته فقد وجدوا ان فيروس الادينو متواجد في عينات مياه الصرف الصحي بنسبة (١٠٠%) ، وبنسبة (٨٢%) في عينات مياه الصرف الصحي المعالجة ثانويا باستخدام تقنية (PCR) (7) . تكون فيروسات الادينو مقاومة لبعض عمليات معالجة المياه وتستطيع البقاء على قيد الحياة في هذه المياه لفترات اطول من بكتريا القولون (23). بينت العديد من الدراسات ضعف العلاقة او عدمها بين المؤشرات البكتريولوجية (heterotrophic bacteria and coliforms)من التلوث البرازي والفيروسات المعوية في المياه الملوثة (3,19,16,17) .

ان معدل انتشار فيروس الادينو يعتبر كمؤشر للتلوث الفيروسي في البيئات المختلفة ، اذ ان امكانية استخدام فيروسات الادينو كمؤشر للتلوث في المياه يتطلب فهما واضحا لفعاليات الفيروس ومعرفة تامة بأساليب الكشف عن الفيروس وطرق القياس الكمي له (21,17) ،ان كفاءة التحري عن الفيروسات تعتمد على الطرق المستخدمة في الكشف عن الاعداد القليلة جدا للفيروس والمتواجدة في كميات كبيرة من المياه ، ان طرق الفحص المختلفة المستخدمة في الكشف عن الفيروس سوف تعطي نتائج متغايرة بالاعتماد على كيميائية الماء والمواد والجسيمات الذائبة فيه (10) .

يُحدد تركيز فيروس الادينو باستعمال العديد من التقنيات مثل تقنية الزراعة النسيجية " tissue culture techniques" التي تستخدم بشكل تقليدي لتحديد تركيز الفيروس في كمية معينة من الماء والتي تكون كافية لإحداث الاصابة ، لكن هذه الطريقة تستغرق وقت طويل و بطيئة و ذات تكلفة

عالية وتمتلك حساسية متغايرة ، لذلك استخدمت تقنيات اكثر سرعة واعلى حساسية مثل (standard PCR ، nested PCR ، integrated cell culture PCR و quantitative PCR) التي لها القدرة على تزويدنا بالعديد من التفسيرات المحتملة (20,4,12) .

كان الهدف من الدراسة هو الكشف عن وجود فيروس الادينو في عينات المياه المأخوذة من مناطق مختلفة من شط الحلة وعدد من البزول الموجودة في مركز المدينة ، ناحية الهاشمية وقضاء المحاويل.

المواد وطرق العمل :

جمع العينات :

جمعت (٨٠) عينة ماء من مناطق مختلفة من شط الحلة وعدد من البزول الموجودة في مركز المدينة ، ناحية الهاشمية وقضاء المحاويل للفترة من كانون الثاني (٢٠١٥) الى كانون الثاني (٢٠١٦) ، وُضعت العينات في حاويات بلاستيكية خاصة بالجمع نظيفة ومعقمة سعة (٥٠) مللتر ونقلت بشكل مبرد الى المختبر وحفظت بدرجة حرارة (٤) م° بعدها تمت تصفية المياه المجموعة تصفية ابتدائية باستعمال المرشحات الدقيقة "Millipore filter" ذات القطر(٠،٢٢) مايكروليتر وكما هو مذكور في (1) ، بعدها تمت التصفية الثانوية باستعمال فلاتر الديلزة "Dialysis filter" (model HF80S) ، ثم ركزت عينات المياه المصفاة اعلاه باستخدام تقنية الترسيب بالبولي اثيلين كلايكول "precipitation with polyethyl glycoo (PEG)" وكما هو مذكور في طريقة (Lewis and Metcalf) وحفظت بدرجة (-٢٠) م° لحين اجراء الفحوصات اللازمة (13) .

اختبار الكاسيت (الشريط) :

أُخضعت (٨٠) عينة ماء بعد تركيزها الى الفحص باستعمال الكاسيت (الشريط) المجهز من قبل شركة (BioMérieux) الفرنسية للتحري عن وجود فيروس الادينو في عينات المياه واجريت طريقة العمل حسب تعليمات الشركة المصنعة .

استخلاص ال DNA :

أُستخلص الحامض النووي (DNA) من عينات المياه المحفوظة باستعمال عدة استخلاص الحامض النووي المزودة من شركة (INtRON Biotechnology) الكورية وقد اجريت طريقة العمل بحسب تعليمات الشركة المصنعة ، وقد جمدت العينات بدرجة حرارة (- ٢٠) م° لحين استخدامها في تفاعلات ال PCR .

الكشف عن فيروس الادينو باستخدام تقنية Nested - PCR:

تنقسم هذه الطريقة الى مرحلتين :

المرحلة الاولى :

في هذه المرحلة يمزج (٥) مايكروليتر من الحامض النووي المستخلص مع (١٢،٥) مايكروليتر من خليط ال PCR (Master Mix) المجهز من قبل شركة (Promega , USA) مع اضافة (١) مايكروليتر من البادئ hex 1885 بتركيز (١٠) بيكومول/مايكروليتر (GCC GCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C) و (١) مايكروليتر من البادئ hex 1913 بتركيز (١٠) بيكومول/مايكروليتر (CAG CAC GCC GCG GAT GTC AAA GT) ، غلقت الانابيب ووضعت في جهاز ال PCR "Multigene gradient (USA)" وبُرمج الجهاز على النحو الاتي:

عدد الدورات		درجة الحرارة	الوقت اللازم
دورة واحدة	المسخ **(Denaturation)**	٩٤ م°	٤ دقيقة
٣٠ دورة	**المسخ (Denaturation)**	٩٥ م°	٤٥ ثانية
	اعادة الارتباط (Annealing)	٥٥ م°	٤٥ ثانية
	الاستطالة (Extension)	٧٢ م°	١ دقيقة
دورة واحدة	التمديد **النهائي (Final extention)**	٧٢ م°	٥ دقيقة
دورة واحدة	خفض درجة الحرارة	٤ م°	α

حُضر هلام الاكاروز بتركيز (٢%) مع اضافة (٠،٥) مايكروليتر من صبغة الاثيديوم بروماید ، ورحل ناتج المرحلة الاولى بجهاز الترحيل الكهربائي لمدة ساعة واحدة وبفولتية مقدارها (١٠٠) فولت ، بعدها قُرئت نتيجة الترحيل الكهربائي باستعمال جهاز انبعاث الاشعة فوق البنفسجية UV transiluminator "UV Light (Japan)" للتقصي عن وجود قطعة المورث والتي يبلغ طولها (٣٠١) زوج قاعدي.

المرحلة الثانية :

يمزج (٥) مايكروليتر من ناتج التضخيم الاول مع (١٢،٥) مايكروليتر من خليط الPCR (Master Mix) المجهز من قبل شركة (Promega) مع اضافة (١) مايكروليتر من البادئ nehex 1893 بتركيز (١٠) بيكومول/مايكروليتر(GCC ACC GAG ACG TAC TTC

AGC CTG) و nehex 1905 (١٠) بيكومول/مايكروليتر (TTG TAC GAG TAC GCG GTA TCC TCG CGG TC) ، غلقت الانابيب ووضعت في جهاز ال PCR وبُرمج الجهاز تحت نفس ظروف المرحلة الاولى .

النتائج :

نتائج اختبار الكاسيت (الشريط)

اظهرت نتائج فحص ٨٠ عينة ماء مأخوذة من نهر الحلة وثلاث من البزول الموجودة في مركز المحافظة و قضاء الهاشمية والمحاويل ان (٤٣) عينة كانت موجبة لفحص الكاسيت من اصل (٨٠) عينة وبنسبة (٥٣,٧٥%) ، اذ بينت النتائج ان (٩) عينات ماء مأخوذة من اماكن متفرقة من نهر الحلة كانت موجبة لفحص الكاسيت (الشريط) من اصل (٢٠) عينة وبنسبة (٤٥%)، بينما كانت نتائج فحص عينات مياه البزول كالتالي ، (١٢) عينة موجبة للفحص من اصل (٢٠) عينة وبنسبة (٦٠%) ، (١١) عينة موجبة من اصل (٢٠) عينة وبنسبة (٥٥%) ، (١١) عينات موجبة من اصل (٢٠) عينة وبنسبة (٥٥%) للبزول (١) و (٢) و(٣) على التوالي وكما هو موضح في جدول (١) .

جدول (١) : يبين عدد العينات الموجبة لفيروس الادينو باستخدام فحص الكاسيت (الشريط)

Table (1): Number of positive result for Adenovirus using cassette (stripe) test

مكان اخذ العينة Sample position	العدد الكلي للعينات المأخوذة Total sample number	عدد النماذج التي اعطت نتيجة موجبة Number of positive sample	النسبة المئوية %
نهر الحلة	٢٠	٩	%٤٥
البزل (١)*	٢٠	١٢	%٦٠
البزل (٢)**	٢٠	١١	%٥٥
البزل (٣)***	٢٠	١١	%٥٥
العدد الكلي	٨٠	٤٣	%٥٣,٧٥

البزل (١)* : مركز محافظة بابل **البزل (٢)**** : قضاء الهاشمية **البزل (٣)**** : المحاويل

وقد تم احتساب قيم الحساسية والخصوصية لفحص الشريط السريع بالاعتماد على طريقة (1) وكانت نتائج حساسية فحص الشريط السريع وخصوصيته (٧٩،٦٢ و ٧٧،٠٨) على التوالي .

نتائج اختبار nested- PCR للكشف عن فيروس الادينو في عينات الماء

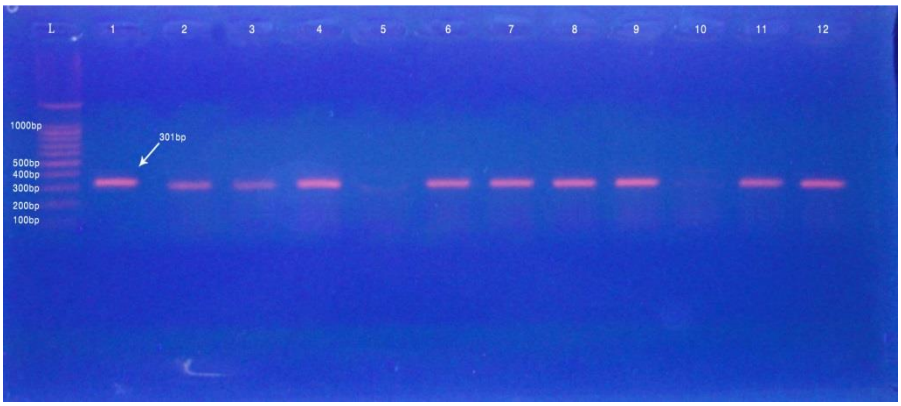
اوضحت النتائج باستخدام تقنية nested – PCR ان (٣٢) عينة ماء اعطت نتيجة موجبة للفحص من اصل (٨٠) عينة وبنسبة (٤٠%) ، اذ لوحظ وجود فيروس الادينو في (٦) عينات ماء من اصل (٢٠)عينة ماخوذة من نهر بالحلة ، في حين بينت النتائج ان (١٠) عينة كانت موجبة من اصل (٢٠) عينة بالنسبة للبزل (١) ، (٩) عينة موجبة من اصل (٢٠) عينة بالنسبة للبزل (٢) و(٧) عينة موجبة من اصل (٢٠) عينة بالنسبة للبزل (٣) وكما هو موضح في جدول (٢) .

جدول (٢) : نتائج فحص nested – PCR للكشف عن فيروس الادينو

Table (2) : Results of nested – PCR for Adevovirus detection

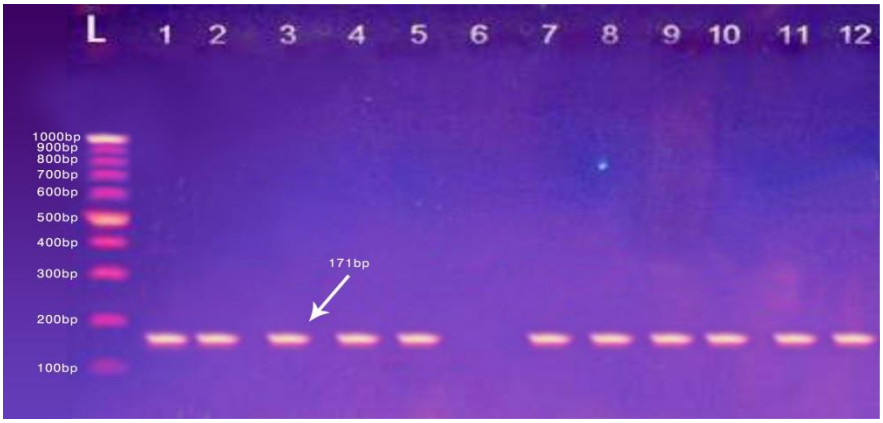
مكان اخذ العينة Sample position	العدد الكلي للعينات المأخوذة Total sample number	عدد النماذج التي اعطت نتيجة موجبة Number of positive sample	النسبة المئوية %
نهر الحلة	٢٠	٦	%٣٠
البزل (١)*	٢٠	١٠	%٥٠
البزل (٢)**	٢٠	٩	%٤٥
البزل (٣)***	٢٠	٧	%٣٥
العدد الكلي	٨٠	٣٢	%٤٠

ففي هذا الاختبار تم التقصي عن وجود قطع المورث البالغ طولها (٣٠١) زوج قاعدي بالنسبة للمرحلة الاولى وكما هو موضح في الشكل (١) .



شكل (١) : الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنتائج تضخيم المرحلة الاولى . يمثل الحرف L المادة الواسمة للدلالة على الاطوال القاعدية مقدرة بالزوج القاعدي 100bp DNA ladder ، الحفر (12-911-8-7-6-4-3-2-1) تمثل النتيجة الموجبة لناتج تضخيم المرحلة الاولى والمتمثلة بالزوج القاعدي (301 bp) ، اما الحفر (5 و 10) فتمثل النتيجة السالبة .

بعدها اخذت العينات التي اعطت نتيجة موجبة في المرحلة الاولى وأُخضعت للمرحلة الثانية من ال PCR وتم البحث عن قطع المورث البالغ طولها (١٧١) زوج قاعدي للتأكد من وجود الفيروس في عينات الماء وكما هو موضح في الشكل (٢).



شكل (١) : الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنتائج تضخيم المرحلة الاولى . يمثل الحرف L المادة الواسمة للدلالة على الاطوال القاعدية مقدرة بالزوج القاعدي 100bp DNA ladder ، الحفر (12-11-10-9-8-7-5-4-3-2-1) تمثل النتيجة الموجبة لناتج تضخيم المرحلة الثانيه والمتمثلة بالزوج القاعدي (171 bp) ، اما الحفرة (6) فتمثل نتيجة سالبة .

المناقشة

يوجد فيروس الادينو في مياه الصرف الصحي بترددات عالية ويبدي الفيروس مقاومته العالية للبقاء عند معالجة هذه المياه . تنتقل الإصابة بفيروس الادينو عن الطريق البرازي – الشفوي ، ان تلوث المياه المستخدمة للشرب او المياه المستخدمة في احواض السباحة بهذا الفيروس يشكل مصدر خطر كبير على الاشخاص المستهلكين لهذه المياه والمتعاملين معها . تم اتخاذ العديد من الاجراءات الوقائية للسيطرة على تواجد الفيروسات في المياه ، ولكي يكون الكشف فعال فلا بد من معرفة مستوى التلوث بالفيروس ومدى عدوته ، وحتى الوقت الحالي لا توجد هنالك طريقة كشف عن الفيروس تجهز كل هذه المعلومات والتي يمكن استخدامها بشكل فعال للإدارة التلوث البيئي ولتقييم المخاطر الصحية على الانسان (2) . ان فعالية الكشف عن الفيروسات تعتمد على كفاءة الطريقة التي تستخرج بها عينات المياه ،اذ تكون جودة المياه في الانواع المتشابهة حول العالم متغيرة بشكل كبير ، وتتفاوت الفيروسات المعوية تفاوتا كبيرا في الحجم و الخصائص السطحية . تم تطوير العديد من طرق الكشف عن الفيروسات بالاعتماد على امتصاصها مثل فيروس شلل الاطفال الذي ابدى امتصاصية عالية بالمقارنة مع الفيروسات المعوية الاخرى بسبب نقطة تساوي الكهربائية ، نوع البروتين السطحي وطريقة تكوينه ، انواع المستقبلات السطحية والتشكيل الفيزيائي للفيروس (10, 11) . وفي التجربة الحالية تم استخدام فلاتر الديلزة لفصل الفيروس وهي طريقه جيدة ومفيدة

للحصول على الفيروس من دون حدوث اي تغيير في تركيب الفيروس او سطحه الخارجي وتعتبر هذه الطريقة مفيدة لكل انواع الفيروسات . وتؤثر نوعية المياه ودرجة ملوحتها على مدى تواجد الفيروس اذ يحتاج هذا الجانب العديد من الدراسات والاقتراحات للبحث عن الفيروس الهدف . كشفت العديد من الدراسات عن فيروس الادينو باستخدام تقنيات (qPCR و nested PCR) واوضحت هذه الدراسات ان تقنيه (qPCR) تكون اقل حساسيه للكشف عن الفيروس بالمقارنه مع تقنيه (nested PCR) (6,12,10) .

ان استخدام تقنيه (PCR) للكشف عن الفيروس في عينات المياه المجموعة في هذه الدراسة واجهت بعض الصعوبات في تفسير خطر الإصابة بالفيروس ، وقد بينت الدراسة الحالية ان نسبه تواجد فيروس الادينو في مياه نهر الحله كانت اقل من نسبتها في مياه الجداول والسبب في ذلك يعود الى تفريغ مياه الصرف الصحي في الجداول البعيده عن عيون السلطات ودائرة البلديه بالاضافه الى كبر مساحه الانهار بالمقارنه مع الجداول ، وهذا يفسر ايضا زياده نسبة اصابه الاطفال الساكنين في الاقضيه والنواحي بالفيروس لان غالبيتهم يعتمدون على مياه السواقي والجداول في الشرب والطبخ والاستحمام .

المصادر :

1. AL- Khafaji.Y.A.R and AL-Jiboury.H.J (2013) . Detection of Rotavirus in diarrhea stool samples of children with acute gastroenteritis in Babylon governorate, Iraq . (IRJM) Vol. 4(3) pp. 84-88, March.
2. Al-khafajia.Z.A.I & Al-Mola b.G.A (2013) . Detection of Adenovirus Type F and G in Children Less Than Five Years Suffering from Acute Gastroenteritis in Hilla Province . Medical Journal of Babylon-Vol. 10- No. 3 .
3. Bosch, A., Lucena, F., Diez, J.M., Gajardo, R., Blasi, M. and Jofre, J. (1991). Human enteric viruses and indicator microorganisms in a water supply associated with an outbreak of infectious hepatitis. J Am Water Works Assoc 83, 80–83.
4. Choi, S. and Jiang, S.C. (2005) . Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. Appl Environ Microbiol 71, 7426–7433.

5. Genthe, B., Gericke, M., Bateman, B., Mjoli, N. and Kfir, R. (1995) . Detection of enteric adenoviruses in South African waters using gene probes. Water Sci Technol 23, 2091– 2098.
6. Greening, G., Hewitt, J. and Lewis, G. (2002) . Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. J Appl Microbiol 93, 745– 750.
7. Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K. and Ohgaki, S. (2007) . Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. J Appl Microbiol 103, 2153–2159.
8. Horwitz, M.S. (2001) . Adenoviruses. In Field's Virology ed. Knipe, D.M. and Howley, P.M. pp. 2327–2359. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
9. Huang, M.L., Nguy, L., Ferrenberg, J., Boeckh, M., Cent, A. and Corey, L. (2008) . Development of multiplexed realtime quantitative polymerase chain reaction assay for detecting human adenoviruses. Diagn Microbiol Infect Dis 62, 263–271.
10. Lambertini, E., Spencer, S.K., Bertz, P.D., Loge, F.J., Kieke, B.A. and Borchardt, M.A. (2008) . Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. Appl Environ Microbiol 74, 2990–2996.
11. Langlet, J., Gaboriaud, F., Duval, J. and Gantzer, C. (2008) . Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes. Water Res 42, 2769–2777.
12. Lee, S.H., Lee, C., Lee, K.W., Cho, H.B. and Kim, S.J. (2005).The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture-multiplex-nested PCR procedure. Appl Microbiol 98, 1020–1029.

13. Lewis, G.D. and Metcalf, T.G. (1988) . Polyethylene Glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis a virus and human rotavirus from oyster water and sediment samples. Appl Environ Microbiol 54, 1983–1988.
14. Lin, K., Lin, Y., Chen, H., Ke, G., Chiang, C., Hwang, K., Chu, P., Lin, J. et al. (2004). A two decade survey of respiratory adenovirus in Taiwan: the reemergence of adenovirus types 7 and 4. J Med Virol 73, 274–279.
15. Metcalf, T.G., Melnick, J.L. and Estes, M.K. (1995). Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – a trip of 50 years. Annu Rev Microbiol 49, 461–487.
16. Muniain-Mujika, J., Girones, R. and Lucena, F. (2000) .Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. J Virol Methods 89, 109–118.
17. Muscillo, M., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Fontana, S., Di Grazia, A., Manzara, S., Fadda, G., Santangelo, R. et al. (2008). Detection and quantification of human adenoviruses in surface waters by nested PCR, TaqMan real-time PCR and cell culture assays. Water Air Soil Pollut 191, 1–11.
18. Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J. and Girones, R. (1998) .Viral pollution in the environment and in shellfish: human Adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. Appl Environ Microbiol 64, 3376–3382.
19. Pinto, R.M., Gajardo, R., Abad, F.X. and Bosch, A. (1995) . Detection of fastidious infectious enteric viruses in water Environ Sci Technol 29, 2636–2638.
20. Reynolds, K.A. (2004). Integrated cell culture / PCR for detection of enteric viruses in environmental samples. Methods Mol Biol 268, 69–78.

21. Rigotto, C., Sincero, T.C.M., Simoes, C.M.O. and Barardi, C.R.M. (2005). Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrate cell culture PCR (ICC／PCR). Water Res 39, 297– 304.
22. Uhnoo, I., Svensson, L. and Wadell, G. (1990) Enteric adenoviruses In Balliere's Clinical Gastroenterology ed. Farthing, M.J.G. pp. 627–642. London: Balliere Tindal
23. WHO. (2006) Microbial aspects. In: Guidelines for Drinking- Water Quality, 1st ad., 3rded. pp. 121–144. Geneva: World Health Organization.