الكشف عن التباين الوراثي لطفيلي الاكياس العدرية (Hydatid cysts) المستأصل من الاغنام لمناطق مختلفة من العراق بأستخدام تقانة التفاعل التضاعفي (PCR) [+]

DETECTION OF POLYMORPHISM OF HYDATID CYSTS PARASITE ISOLATED FOR DIFFERENT REGIONS OF IRAQ USING PCR TECHNIQUES

يحيى قاسم حسين [*] سلوى صبرمحسن [*] بان نوري عبد اللطيف [**]

المستخلص:

تم في هذا البحث دراسة مرض الاكياس العدرية على المستوى الجزيئي بالاعتماد على عشرين نموذج لطفيلي الاكياس العدرية المستأصلة من المضائف الوسطية (الاغنام) ومن مناطق جغرافية مختلفة من القطر .

استخدمت تقانة الـ Polymerase chain reaction (PCR) ،، تقانة التفاعل التضاعفي ،، وبالذات تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال (RAPD) لسلسلة الدنا Random amplified polymorphic في هذه الدراسة للكشف عن التباينات الوراثية بين الدنا المعزول من طفيلي الاكياس العدرية وذلك عن طريق حساب عدد الحزم المتضاعفة من جراء استخدام البادئات العشوائية وعددها ٤ وحساب الاوزان الجزيئية لهذه الحزم فيظهر التباين الوراثي للانماط المدروسة وفقاً لغياب او عدم وجود حزم التضاعف وكانت النتائج كالآتي :

- التوصل الى ايجاد بادئ وهو OPF ١٩- قادر على تشخيص دنا العينات للاكياس العدرية المعزولة من الاغنام للمناطق الوسطى بالمؤشر الوراثي OPF-19 1050bp .
- التوصل الى ايجاد بادئ وهو OPF -16 قادر على تشخيص:

١. دنا العينات للاكياس العدرية المعزولة من الاغنام للمناطق الشمالية بالمؤشر الوراثي OPF-16 650bp .

٢. دنا العينات للاكياس العدرية المعزولة من المناطق الشمالية بالمؤشر الوراثي OPF-16 500bp .

- التوصل الى ايجاد بادئ وهو OPF- 6 قادر على تشخيص:

١. دنا عينات الاكياس العدرية المعزولة من الاغنام للمناطق الوسطى بالمؤشرين الوراثيين OPF-6 460bp 770bp .

٢. دنا عينات الاكياس العدرية المعزولة من الاغنام للمناطق الجنوبية بالمؤشر الوراثي OPF-6 650bp .

Abstract:

[+] تاريخ استلام البحث : ٢٠٠٧/٨/١٣ ، تاريخ قبول النشر : ٢٠٠٨/٥/٢٧

[*] استاذ مساعد / المعهد الطبي التقني بغداد

[**] مدرس / كلية العلوم / جامعة بغداد

This research includes a study of hydatid *cysts parasite* on the molecular level where 20 samples of hydatid cyst were collected from intermediates host (sheep) for different geographical regions of Iraq.
Genetic analysis of isolated DNA from hydatid cyst collected from sheep was done by polymerase chain reaction (PCR)to determine genetic variation depending on random amplified polymorphic DNA "RAPD" .
The current results of this study have shown the following:

1. **It was found the primer OPF-19 was able to diagnose samples the represent the isolated DNA of hydatid cysts parasite which was collected from sheep in intermediates regions of Iraq by genetic marker OPF-19 1050bp .**
2. **Ability of RAPD markers to determine markers of OPF-16 65obp specified to samples of hydatid *cysts* DNA which was collected from sheep in northern regions of Iraq , and another marker which was OPF-16 500bp specific for samples collected from sheep in northern regions of Iraq .**
3. **Ability of RAPD markers to determine two markers OPF – 6 770 bp , 460pb for samples which was collected from hydatid cysts of sheep in Intermediat regions of Iraq,and other marker which was OPF -6 650bp specific for samples collected form hydatid cysts of sheep in Southern regions of Iraq .**

المقدمة:

يعد مرض الاكياس العدرية من الامراض المتوطنة على مساحات واسعة من العالم وتزداد حالات الاصابة بهذا المرض في الدول تحت النامية سيما بين التجمعات السكانية في المناطق الريفية التي يتعايش فيها الانسان بتماس وجهل مع الكلاب (المضيف النهائي) وبقية الحيوانات الاليفة التي ربما تمثل مضائف وسطية (كالاغنام وغيرها) .[١] سيما اذا علمنا ان الكلب قد يحمل الآف الديدان البالغة التي تطرح مئات البيوض اسبوعياً ، من هذا يتضح جلياً ان المناطق التي تتوطن فيها الاصابة بين الكلاب بصورة عالية ستكون بيئتها ملوثة بملايين البيوض يومياً مما يعطي دلائل موثقة للاخطار التي تهدد الانسان القاطن في تلك المناطق .[٢]

ان لهذا المرض اهمية صحية واقتصادية كبيرة كونه يصيب الاعضاء المهمة في الانسان والحيوان مثل : الكبد ، الرئة ، والطحال ، الكلية وكذلك الاعضاء التي من الصعوبة علاجها وهي العمود الفقري ، الدماغ ، والاوعية الدموية . [٣] وقد اعتمدت واحدة من اهم تطبيقات مؤشرات الدنا وهي تقانة التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا في هذه الدراسة وان مؤشر RAPD عموماً من المؤشرات التي تتبع السيادة التامة (Dominant markers)لتحديد التباينات الوراثية والتمييز والتشخيص المبكر من خلال مقارنة الاشكال متمثلاً في وجود او غياب حزم التضاعف (Bands) للانماط الوراثية للافراد المدروسة في بيئات جغرافية مختلفة من العراق لاتخاذ الوسائل الضرورية لغرض مقاومة الطفيلي ومنع انتشاره .

المواد وطرائق العمل:

تم عزل المادة الوراثية (DNA) من عينات الأكياس العدريةالتي جمعت من المجازر في المحافظات الوسطى، الجنوبية والشمالية من العراق ومن مصادر الأغنام للفترة من نيسان ٢٠٠٥ الى حزيران ٢٠٠٦ .

تم أخذ ١ سم^3 من نسيج الطبقة المولدة لكل من الأكياس العدرية المستأصلة من الأغنام والمحفوظة لمدد متباينة في ٧٠% كحول أثيلي ، وتوضع على حدة في أنبوب حجم 1.5 مل ، يضاف إليها ٧٠٠ مايكروليتر من محلول Protienase buffer . [4]

يقطع النسيج داخل الأنبوب باستخدام مقص حاد معقم صغير الى قطع صغيرة جداً ، ثم يضاف ٣٥ مايكروليتر من محلول الأنزيم Protienase – K ، ثم يحضن بدرجة حرارة ٥٥ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة ، بعد ذلك يضاف ١٠ مايكروليتر من محلول الأنزيم محلل الرنا RNAase ويحضن لمدة ساعة بدرجة حرارة ٣٧ مئوية ، يضاف حجم مماثل من المحلول فينول / كلوروفورم / كحول الأيزواميل ويرج بجهاز الرج الكهربائي المبرد نوع Backman centrifuge TJ-6 لمدة دقيقة واحدة ، ثم يطرد مركزياً بسرعة ١٢٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة ، وتسحب الطبقة العلوية وتنقل الى أنبوب نظيف وتكرر هذه العملية الى أن تختفي الطبقة البيضاء الوسطية ، يضاف ٠,٦ من حجم الرائق كحول الأيزوبروبانول ويترك لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة ، ثم يطرد مركزياً بسرعة ١٤٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق ، يهمل الرائق ويغسل الراسب بالكحول الأثيلي ٧٠% مرة وبالكحول الأثيلي ٩٥% مرة أخرى ، ويترك الأنبوب مفتوحاً ليجف تماماً من الكحول ثم يذاب الدنا بإضافة ١٥٠ مايكروليتر من المحلول دارئ TE (يحضر بمزج ١٠ ملي مولر من Tris-base مع ١ ملي مولر من EDTA)، ويحضن لمدة ساعتين بدرجة ٦٥ مئوية حتى يذوب تماماً ويحفظ بعد ذلك بدرجة حرارة – ٢٠ مئوية .

وبعد أن تم توصيف الدنا Characterization of DNA وذلك بقياس تركيز الدنا وتقدير نقاوته [5] نجري تفاعل التضاعف المسمى RAPD استناداً الى [6] والذي يشمل الخطوات الآتية :-

- تم تحضير خليط التفاعل الرئيسي (Master Mix) وذلك بمزج المكونات الآتية في أنبوبة معقمة وبالتراكيز المبينة إزاء كل مادة :-

المكونات	الحجم لعينة واحدة	التركيز النهائي	٢٠ عدد العينات المدروسة
ماء مقطر	١٧,٧	–	٣٥٤
محلول منظم بقوة X ١٠	٢,٥	١X	٥٠
DNTPs	٠,٥	٢٠٠ MM	١٠
البادئ	٢	IO PMol /R	٤٠
انزيم البلمرة	٠,٣	١,٥ u/R	٦,٠
٢٣ Ml + 2Ml of DNA (50ng/Mol)			

- ثم مزج المكونات جيداً باستخدام vortex لمدة ٣٠ ثانية ، وبعدها يوضع في المنبذة لمدة ٣٠ ثانية لترسيب قطرات المحلول المتعلقة على جدار الأنبوبة .
- وزعت المحتويات للإغنام 460 لكل أنبوبة من الأنابيب الصغيرة (Eppendorf) سعة ٠,٥ مل معلمة بأسماء العزلات العشرين قيد الدراسة .
- أضيفت ٢ مايكروليتر من دنا كل عينة ممثلة للصنف وذلك بعد إجراء التخافيف للنماذج المركزة باستخدام الماء المقطر للوصول الى الحجم النهائي المطلوب بدء التفاعل التضاعفي المتعدد الأشكال

لسلسلة الدنا والذي تراوح بين ١٠-٥٠ نانوغرام لكل مايكروليتر من عينة الدنا [7] ليصبح الحجم النهائي ٢٥ مايكروليتر.

- تمزج جيداً وتوضع بالمنبذة لعدة ثواني لجمع محتويات التفاعل في قعر الأنبوبة وبعد ذلك يضاف لكل أنبوبة من ٢٠-٢٥ مايكروليتر زيت معدني (Mineral oil) لمنع التبخر أثناء عملية التضاعف التي تصل فيه درجة الحرارة الى 9 م^{o} [8] .
- تنقل الأنابيب الى جهاز المبلمر الحراري الحلقي(Thermocycler) لبدء التفاعل التضاعفي وفقاً للبرنامج الآتـــــي :-

دورة واحدة لمدة ٢ دقيقة على درجة ٩٤ م^{o} للمسخ الأولي لشريط الدنا . ٤٠ دورة تضاعف كل دورة دقيتان على درجة ٩٢ م^{o} لمسخ القالب ودقيقة واحدة على درجة حرارة ٣٦ م^{o} لربط البادئات بالدنا القالب ٢ دقيقة على درجة حرارة ٧٢ م^{o} لاستطالة البادئات المرتبطة مع دورة أخيرة واحدة للاستطالة لمدة ١٠ دقائق وعلى درجة حرارة ٧٢ م بوصفها دورة أخيرة للاستطالة النهائية .

- ترفع الأنابيب من المبلمر الحراري وتسحب العينات تحت الزيت بحجم ٢٣-٢٤ مايكروليتر ثم تخرج٣مايكروليتر من محلول التحميل .
- تحضير هلام الأكاروز بتركيز ١,٢% وتم ترحيل العينات بالحفر مع الدليل الحجمي المتكون من دنالامبدا المقطع بأنزيمEco١ ولمدة ٤-٥ ساعات .
- تم فحص الهلام بعد صبغه بصفة بروميد الأثيديوم وتحت الأشعة فوق البنفسجية Uv – light صور الهلام بأستخدام جهاز تصوير وأفلام نوع Black ,White Flim Type 667 Polariod
- تم تقدير الأوزان الجزيئية للقطع المتضاعفة بالأعتماد على مواقع الحزم ذات الأوزان المعروفة والناتجة من قطع دنا الأنزيم Eco1 فقط التي عدت دليلاً حجمياً قياسياً .
- تم اختباراربع بآدئات وهي :-

OPF – 06 GGGAATTCGG
OPF – 19 CCTCTAGACC
OPF – 13 GGCTGCAGAA
OPF – 16 GGAGTACTGG

من البادئات المنتجة من قبل Operon Technologies Alamed A لأستخدامها في التحاليل النهائية لتجارب RAPD وتم تحويل النتائج التي ظهرت في الهلام الى الجداول Brinary Character وذلك بوضع ١ عند وجود حزمة و٠عند غياب الحزمة وتم تقدير الأوزان الجزيئية لنواتج التضاعف موازنة مع الدليل الحجمي Eco1 فقط ولغرض تشخيص كل صنف من الأصناف المدروسة تم إيجاد مؤشر خاص لبعض العزلات Cultivar Specific marker وذلك بظهور حزمة في ذلك الصنف دون بقية الأصناف .

<u>النتائج والمناقشة:</u>

اعتمد في هذه الدراسة تحليل نتائج RAPD لتحديد التبيانات الوراثية بين عينات طفيلي الاكياس العدرية اعتماداً على وجود او عدم وجود الحزم المتضاعفة للبادئات المستخدمة في هذه الدراسة وكالآتي :-

١. البادئ OPF -19

اظهرت مضاعفة عينات دنا الاكياس العـــــدرية (٢٠ عينة) المعزولة في المضائف الوسطى (الاغنام) ٤-٦ حزمة تراوحت اوزانها الجزيئية ٥٥٠- ١٠٥٠ زوج قاعدي (شكل (١) جدول (١).

الحزمة ذات الوزن الجزيئي١٠٥٠ زوج قاعدي ظهرت في العينات (٥ ، ٦ ، ٧ ، ٨) والمعزولة من الاكياس العدرية للاغنام من المحافظات الوسطى فقط وبذلك تعد مؤشراً وراثياً OPF-19 1050bp لهذه العينات .

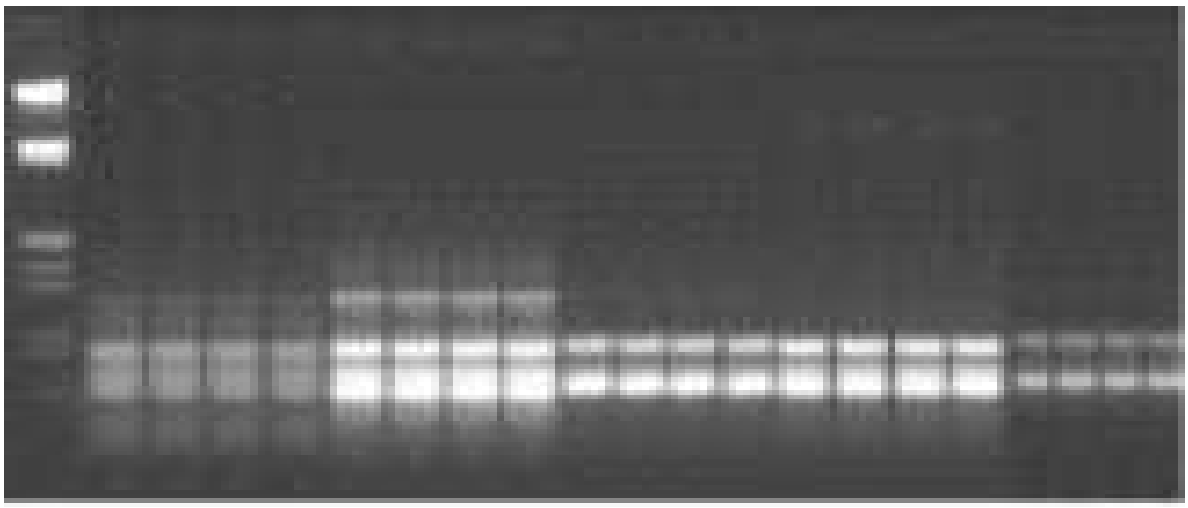
اما الحزم ذات الاوزان الجزيئية ٥٥٠ ،٦٣٠، ٧٥٠، ٨٦٠، ٩٨٠ زوج قاعدي فأنها ظهرت جميع في عينات الاكياس العدرية المعزولة من مختلف محافظات القطر .

٢. البادئ OPF - 13

اظهرت نتائج مضاعفة دنا الاكياس العدرية العشرين بشكل حزم تراوحت اعدادها ٦- ٨ حزمة واوزانها الجزيئية من ٣٠٠ – ٩٠٠ زوج قاعدي شكل (٢) جدول (٢) الحزم ذات الاوزان الجزيئية ٩٠٠ ، ٧٣٠ ، ٥٤٠ ، ٤٢٠ ، ٣٠٠ زوج قاعدي ظهرت في كل العينات المدروسة . اما الحزمتين ذات الوزن الجزيئـــي ٧٩٠ ، ٧٥٠ زوج قاعدي فقد ظهرت فقط في العينات المأخوذة من المضائف الوســطية (الاغنـــام) فـــي المناطق الوسطى والشمالية .

بينما ظهرت الحزمة ذات الوزن الجزيئي ٧٣٠ زوج قاعدي في العينات المأخوذة من الاغنام الخمجة بالاكياس العدرية في المناطق الشمالية والجنوبية .

m	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠



NO of samples

شكل (١): يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز ١,٢% للعينات المأخوذة من الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام للمحافظات الوسطى ، الجنوبية والشمالية من العراق باستخدام البادىءOPF-1 9ولمدة ٣,٥ ساعة وبفولتية مقدارها ٦٥ فولت

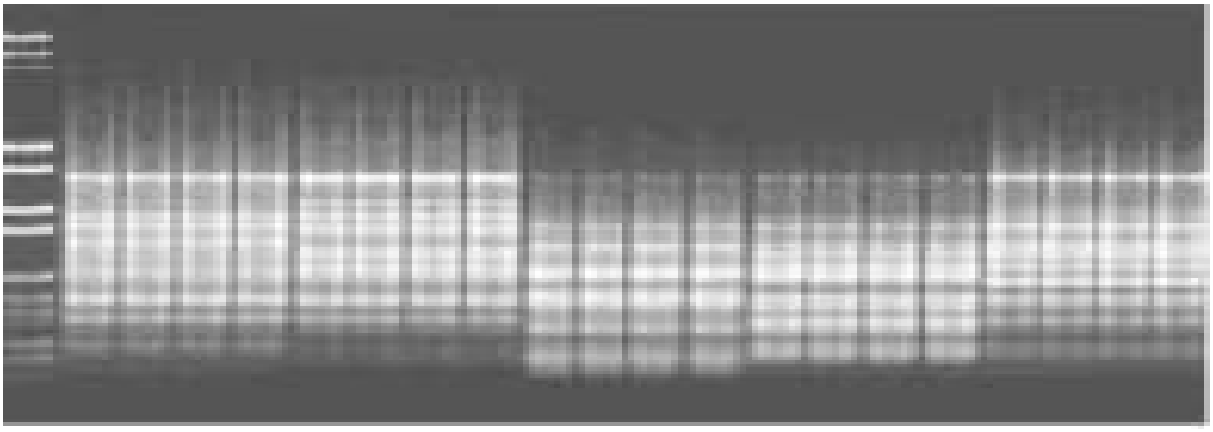
جدول (١): يبين طريقة حساب عدد الحزم الناتجة بأستخدام البادئ OPF-19 للعينات المستخدمة في البحث

Mw bp	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠
١٠٥٠	٠	٠	٠	٠	١*	١*	١*	١*	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠

٩٨٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٨٦٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٧٥٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠
٦٣٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٥٥٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠

***يمثل وجود حزم التضاعف المتباينة.**
١ يمثل وجود حزم التضاعف.
٠ تمثل عدم وجود حزم التضاعف.
العينات من ١- 8 الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام الخمجة في المحافظات الوسطى.
العينات من٩-١٢ الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام الخمجة في من المحافظات الشمالية
العينات من ١٣-٢٠ الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام الخمجة في من المحافظات الجنوبية.

m	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠



NO of samples

شكل (2): يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز ١,٢% للعينات المأخوذة من الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام للمحافظات الوسطى ، الجنوبية والشمالية من العراق باستخدام البادىءOPF-1 3ولمدة ٣,٥ ساعة وبفولتية مقدارها ٦٥ فولت.

جدول (٢): يبين طريقة حساب عدد الحزم الناتجة بأستخدام البادئ OPF-13 للعينات المستخدمة في البحث

Mw bp	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠
٩٠٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٧٩٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٧٥٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٧٣٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٥٤٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٤٢٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٣٧٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٣٠٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١

١ يمثل وجود حزم التضاعف.
٠ تمثل عدم وجود حزم التضاعف.

العينات من ١- 8 الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام الخمجة في المحافظات الوسطى.
العينات من٩-١٢ الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام الخمجة في من المحافظات الشمالية
العينات من ١٣-٢٠ الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام الخمجة في من المحافظات الجنوبية

٣. البادئ OPF – 16

اعطى هذا البادئ نتائج مضاعفة دنا العينات العشرين المدروسة حزماً تتراوح اعدادها من ٢- ٤ حزمة واوزانها الجزيئية تراوحت مابين ٥٠٠ – ٩٨٠زوج قاعدي . شكل (٣) ، جدول (٣)

الحزمة ذات الوزن الجزيئي ٦٥٠ زوج قاعدي قد ظهرت في دنا العينات للاكياس العدرية المعزولة من الاغنام في المناطق الوسطى من القطر .

وبذلك تعد مؤشراً وراثياُ OPF-16 650bp لعينات الدنا المعزولة من المضائف الوسطية (الاغنام) الخمجة بالاكياس العدرية في المناطق الوسطى من القطر عن العينات الاخرى .

والحزمة ذات الوزن الجزيئي ٥٠٠ زوج قاعدي ظهرت فقط في دنا العينات للاكياس العدرية المعزولة من الاغنام في المناطق الشمالية في القطر وبذلك تعد مؤشراً وراثياً (OPF - 16 500 bp) لهذه العينات فقط .

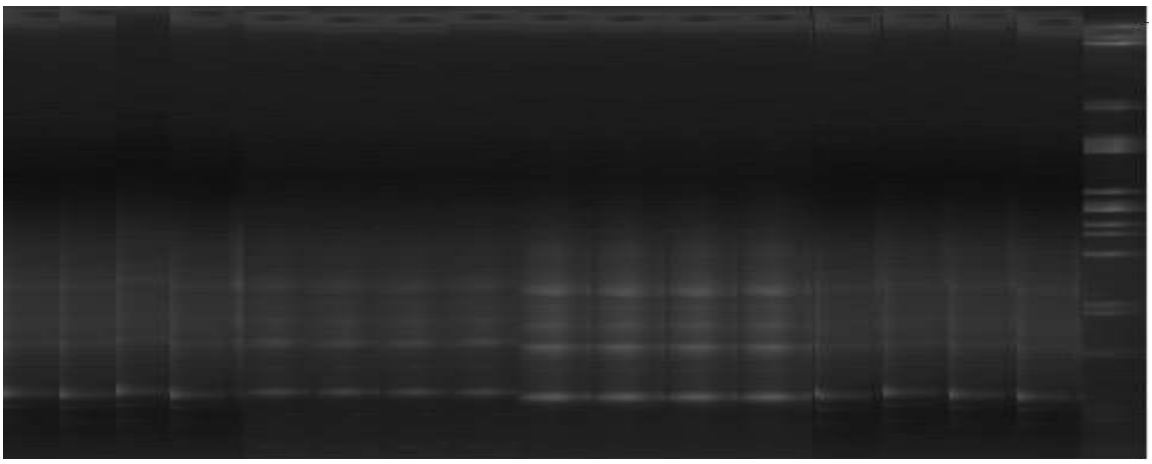
البادئ OPF – 6

حيث اعطى هذا البادئ نتائج مضاعفة دنا العينات العشرين المدروسة حزماً تتراوح اعدادها بين ١-٣ حزمة للعينات المدروسة واوزانها الجزيئية تراوحت بين ٤٦٠ – ١٠٠٠ زوج قاعدي . شكل (٤) ، جدول (٤).

ان الحزمتين ذات الوزنين الجزيئين ٧٧٠، ٤٦٠ زوج قاعدي قد ظهرت في دنا العينات للاكياس الهدرية المعزولة من الاغنام في المناطق الوسطى من القطر . حيث تعدان مؤشرين وراثين , OPF-6 660bp, 770bp لهذه العينات فقط . في حين ظهرت الحزمة ذات الوزن الجزيئي ٦٥٠ زوج قاعدي في عينات الاكياس العدرية المعزولة من الاغنام للمناطق الجنوبية من القطر فقط . وبذلك يعد مؤشراً وراثياً 650bp ، OPF-6 لهذه العينات فقط .

اما الحزمة ذات الوزن الجزيئي ٥٤٠ زوج قاعدي فقد ظهرت في جميع العينات المدروسة والحزمةذات الوزن الجزيئي ١٠٠٠ زوج قاعدي ظهرت في دنا عينات الاكياس العدرية المعزولة من الاغنام للمناطق الشمالية والجنوبية من القطر فقط .

١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠	M



NO of samples

شكل (3): يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز ١,٢% للعينات المأخوذة من الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام للمحافظات الوسطى ، الجنوبية والشمالية من العراق باستخدام البادىء OPF-16ولمدة ٣,٥ ساعة وبفولتية مقدارها ٦٥ فولت .

جدول (٣): يبين طريقة حساب عدد الحزم الناتجة بأستخدام البادئ OPF-16 للعينات المستخدمة في البحث

Mw Bp	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠
٩٨٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠
٨٠٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠
٧٦٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠
٦٥٠	٠	٠	٠	٠	*١	*١	*١	*١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٥٠٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	*١	*١	*١	*١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠

***يمثل وجود حزم التضاعف المتباينة.**

١ يمثل وجود حزم التضاعف.

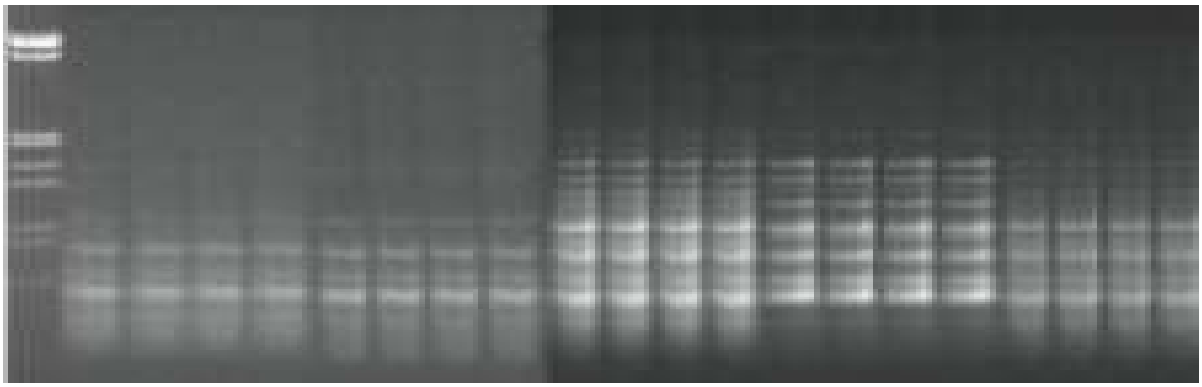
٠ تمثل عدم وجود حزم التضاعف.

العينات من ١ – 8 الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام الخمجة في المحافظات الوسطى.

العينات من٩–١٢ الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام الخمجة في من المحافظات الشمالية

العينات من ١٣–٢٠ الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام الخمجة في من المحافظات الجنوبية.

M	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠



NO of samples

شكل (٤): يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز ١,٢% للعينات المأخوذة من الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام للمحافظات الوسطى ، الجنوبية والشمالية من العراق باستخدام البادىء OPF-6ولمدة ٣,٥ ساعة وبفولتية مقدارها ٦٥ فولت .

جدول (4): يبين طريقة حساب عدد الحزم الناتجة بأستخدام البادئ OPF-6 للعينات المستخدمة في البحث

Mw bp	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠
١٠٠٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠
٧٧٠	*١	*١	*١	*١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٦٥٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	*١	*١	*١	*١	*١	*١	*١	*١
٥٤٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١

٤٦٠	*١	*١	*١	*١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠

***يمثل وجود حزم التضاعف المتباينة.**

١ يمثل وجود حزم التضاعف.

٠ تمثل عدم وجود حزم التضاعف.

العينات من ١-٨ الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام الخمجة في المحافظات الوسطى.

العينات من ٩-١٢ الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام الخمجة في من المحافظات الشمالية

العينات من ١٣-٢٠ الاكياس العدرية المستأصلة من الاغنام الخمجة في من المحافظات الجنوبية.

ان الغاية من هذه الدراسة هي تشخيص طفيلي الاكياس العدرية اعتماداً على معرفة الاختلاقات الوراثية في مضيفه الوسطي (الاغنام) من مناطق جغرافية من القطر .

وبالاستناد الى ماقام به[٩] في دراسة لوبائية مرض الاكياس العدرية المأخوذة من مضائف وسطية (الاغنام والابقار) للفترة من ٩٠-١٩٩٨ في محافظة اربيل شمال العراق حيث اذ اوضحت الدراسة شدة وبائية المرض في الاغنام ودرجة خصوبة الاكياس العدرية اكثر من ٦٤% وهذا يتفق مع ظهور التباينات الوراثية لدنا العينات المعزولة من المضيف الوسطي (الاغنام) من المناطق الشمالية من القطر. [١٠]

وبينت دراسة وبائية اخرى حول معدل انتشار المرض في المناطق الوسطى والجنوبية [١١] نسباً عالية لخصوبة الاكياس العدرية اذ بلغت ٤٩% في الاغنام في المحافظات الوسطى وهي اعلى مما هو عليه في المحافظات الجنوبية اذ بلغت 20.3% وتزداد بازدياد العمر وبدون اعراض سريرية .

وقد امكن بوساطة تقانة RAPD من تحيد ٤ مؤشرات وراثية لدنا عينات اكياس عدرية معزولة من المضيف الوسطي (الاغنام) في المناطق الوسطى من العراق لارتفاع خصوبة الاكياس العدرية فيها ولاحتواء البادئات على محتوى عال من (G-C) اذ تسمى هذه البادئات G-C Rich primer وترتبط هذه البادئات خلال التفاعل على التضاعفي بالمواقع المكملة لها على شريط قالب الدنا اذ ان اختلاف اعداد حزم التضاعف الناتجة بين العينات يدل على ان توزيع هذه المواقع المكملة للبادئات لايكون متساوياً بين العينات المدروسة . [١٢]

اوضحت الدراسة وجود تباينات وراثية لدنا عينات الاكياس العدرية المعزولة من المضيف الوسطي (الاغنام) من مناطق جغرافية مختلفة من القطر وهذا يتفق مع ماتوصلت اليه الدراسات السابقة بهذا الخصوص حيث تمتلك هذه العينات قاعدة وراثية عريضة Borad genetic back ground وبما ان كل حزمة تمثل موقع لذا فأن معرفة هذه المواقع مهمة جداً وتتناسب مع الغاية من استخدام مؤشرات RAPD في الكشق عن مواقع معينة من المجين الكلي للانواع المختلفة دون الاضطرار الى ايجاد الخارطة الوراثية لتلك الانواع . وبالتالي يمكن الاستفادة من هذه المواقع الخاصة عندما ترتبط تلك الحزم بجينات مسؤولة عن صفة معينة . [١٣] و [١٤]

المصادر:

1. Banifacino , R- ; Carter , S.D.; Craig , P.S.; Almeida , Iand Da - Rosa , D.. Assessment of the Immunological surveillance value of humoral and Lymphocyte assays in severe human cystic echmococcosic Tran . Roy. Soc . Trop. Med . Hyg ., 94(1) : 97 – 102 . (2000).
2. Goldman , L . and Bennett , J.C. Textbook of Medicine . 21st edn . Acad . press , New York . .(2000).

3. Scott , J.C and Mcmanus , D.P. The random amplification of polymorphic , DNA can discriminate species and strains of Echinococcus . Ann . Trop . Med .and Parasitol ., 45:1.4 . .(1994).
4. Abraham , K.M.; Longo , N.S and Hwitt , J.A. Detection of transgene integrants and homologus recombination in mice by polymerase chain reaction In : Meltzer , S.J.(ed) . Methods in Molecular biology , vol.92 : PCR in Bioanlysis Human Press , Inc ., N.J . .(1998).
5. Sambrook , J.; Fritsch , E.F and Maniatis , T. Molecular Coloning : A laboratory manual , 2nd edn . cold spring Harbor lab ., New york . (1989).
6. William , J . G.K.; Knbelik ,A.R.; Livak , K.J .; Rafalski , J.A. and Tingey , S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and useful as genetic markers . Nucl . Acid Res ., 18:6531-6535 . (1990).
7. Udupa , S.M.; Weigand , F . ; Saxena , M.C . and Kahl , G.Genotyping with RAPD micro satellite markers resolves pathtype diversity in the Ascochyta blight pathogen of chickpea . Theor . Appl . Genet ., 97 : 229-307 . (1998).
8. Weigmand , F. ; Baum , M. and Udupa , S .. DNA Molecular markers techniques : Technical manual . No. 20. Int. Cent. Agric. Res . Dry Areas., Aleppo . (1993).
9. Saeed . I; Kapel – C ; Saida – LA ; Willingham – L; Nansen – P. Epidemiology of E. granulosus in Arbil province , northern Iraq . 1990 – 1998 .J. Helminthol .Mar; 74(1) :83-8 . . (2000).
10. McManus D.P and Thompson R.C.A. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis Parasitology Vol . 127 : 0-0 Cambridey University press . (2003).
١١. عطية ، امال حسن . دراسة وبائية ومقارنة الصفات الشكلية والبايولوجية للمشوكات الحبيبية بأستعمال رؤيسات الاكياس العدرية المعزولة من بعض المضائف الوسطية . رسالة ماجستير – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد .(٢٠٠٢)
12. Jenkins DJ, Macpherson ,C. Transmission ecology of E. granulosus in wild – life in Australia and Africa . parasitology . 127 suppl : 563 – 72 . .(2003).
13. Haag JL, Ayala FJ , Kamenetzky L ,. Gutierrez AM , Rosenzvit M . Livestock trade history , geography parasite strains : the mitochondrial genetic structure of E . granulosus in Argentina . (2004).
14. Daniel Mwambete K, Ponce. Gordo F, Cuesta – Bandera C .Genetic identification and host range of the Spanish strains of E. granulosus . Acta , Trop . Jul ; 91 (2) : 87 – 93 . (2004).