التحري الجزيئي لطفيلي المتحولة *Entamoeba* Spp. بين الاطفال المصابين بالإسهال في محافظة ذي قار

أ.د فاضل عباس منشد العبادي منار كريم كاظم السعيدي

قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة ذي قار.

الكلمات المفتاحية: المحولة الحالة للنُسج، المتحولة المتغايرة، PCR, Nested PCR.

الخلاصة

إن الغرض من الدراسة الحالية هو التشخيص الجيني لجنس المتحولة *Entamoeba spp.* باستعمال تقنية PCR والتعرف على بعض الانواع التي تصيب الانسان باستعمال Nested PCR بواسطة الجين 18S rRNA المسؤول عن تمييز هذا الجنس وانواعه وتضمنت الدراسة الحالية فحص 300 عينة مجهرياً للمدة من شهر تشرين الثاني 2015 لغاية شهر ايلول 2016 فتبين وجود نسبة إصابة كلية بلغت 26.86 % وعندما اجري الفحص الجزيئي ثُبت وجود نسبة اصابه 35 % *Entamoba* spp، وعندما اجري فحصNested PCR لتحديد الانواع ظهر وجود نسبة إصابة % 39.29 *Entamoeba histolytica* و 39.29 % *Entamoeba dispar*

تُشير نتائج هذه الدراسة الى كفاءة تقنية Nested PCR بتمييز وتحديد انواع الطفيلي بدقة عالية ومصداقية وسرعة عالية بالمقارنة بالفحص المجهري غير القادر على تمييز انواع جنس المتحولة وتساعد الحساسية العالية للطرق الجزيئية للوصول بشكل صحيح للانتشار الحقيقي لأنواع هذا الجنس ويمكن من استعمال هذه الطرق الجزيئية في الدراسات الوبائية.

المقدمة Introduction

داء الأميبات Amoebiasis هو مرض معوي ناجم عن طفيلي أُحادي الخلية يدعى بالمتحولة الحالة للنُسج *Entamoeba histolytica* (Fallah *et al*., 2014).

صُنف داء الأميبات ثالث أهم مسبب للوفاة بالأمراض الطفيلية بعد الملاريا و البلهارزيا وفقاً لمنظمة الصحة العالمية WHO فهو مسؤول عن 40000 -100000 حالة وفاة سنوياً (Marie *et al*., 2015) و سُجل الانتشار العالمي الى ان حوالي 10% من سكان العالم مصاب بداء الأميبات وما يقارب 90% من المصابين حامل للعدوى بدون اعراض Asymptomic في حين ان 10% منهم يتطور الى داء الأميبات الغازي Invasive (Khairnar and Parija, 2007) وتنتشر الاصابة بطفيلي *Entamoeba* Spp. في جميع مناطق العالم عموماً وتتركز بصورة خاصة في الدول النامية في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية وشبه القارة الهندية وفي المناطق ذات المستوى الصحي والثقافي المتدني (Bogitsh and Carter, 2013).

يُصيب طفيلي المتحولة الحالة للنُسج انسجة مختلفة مثل اصابته لأنسجة الامعاء التي تعد الاكثر شيوعاً مسبباً بذلك داء المتحولات الأميبي أو الزحار الأميبي Amoebic dysentery الذي يكون بشكل التهاب طفيلي حاد Acute أو مزمن Chronic, كذلك يُصيب انسجة الكبد مسبباً خراج الكبد Hepatic abscess والبنكرياس والرئتين والدماغ مسبباً داء الأميبات خارج المعوي Extra Intestinal amoebic (Ngui *et al*., 2012).

يمر طفيلي المتحولة الحالة للنُسج بعدة اطوار في دورة حياته لكن أهمها هي الطور المتغذي (الناشطة) Trophozoite stage والطور المتكيس (المعدي) (Infective) cyste stage ويتكاثر لا جنسياً بالانشطار الثنائي Binary fission (Roberts and Janovy, 2009).

تُعد سلالات المتحولة الحالة للنُسج ليست متساوية في الضراوة اذ يُشير الجينوم الى ان سلالة المتحولةHM1:IMSS *E. histolytica* هي الاشد ضراوة وهي الافضل للدراسة وتعد سلالة المتحولة Rahman غير مرضية نسبةً الى سلالةHM1:IMSS, اذ انها ذات قُدرة منخفضة نسبياً على بلعمة كريات الدم الحمر phagocytosis of erythrocytes واحداث الضرر في ظهارة القولون وتكوين خراج الكبد الاميبي (Davis *et al*., 2006) .

يمكن ان تُستغل الخصائص المظهرية للطور المتغذي أو عدد الانوية للطور المتكيس للتمييز بين أنواع جنس المتحولة مجهرياً (Weedall and Hall, 2011),لكن من الصعب التفريق بين الانواع الممرضة وغير الممرضة التي تكون متشابهة شكلياً في الطورين المتغذي والمتكيس (Nath *et al*., 2015).

تُعد الطرائق الجزيئية ومنها تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من أهم الاساليب المستعملة في تشخيص انواع جنس المتحولة الذي تمت الموافقة عليها من قبلWHO Hamzah *et al*., (2010), وذات دقة وحساسية عالية للتمييز بين سلالات النوع الواحد وتحديد الممرضة وغير الممرضة منها ومعرفة التركيب الوراثي وعلاقته بضراوة الانواع الممرضة الذي يساعد في تحديد واختيار العلاج المناسب كما تساعد تقنية PCR على فهم افضل للوبائية من خلال معرفة انتشار وتوطن أنواع هذا الجنس بدقة عالية (الطرفي ,2014).

تُمثل الاصابة بداء الأميبات مشكلة صحية واسعة الانتشار لذا هدفت الدراسة الحالية الى تشخيص طفيلي المتحولة *Entamoeba spp* بأستعمال الفحص المجهري و تأكيد التشخيص في العينات الموجبة مجهرياً باستعمال تقنية PCR, وتمييز انواع جنس المتحولة بتقنية Nested PCR.والتعرف على مدى انتشار الطفيلي في محافظة ذي قار في الاطفال الذين تتراوح اعمارهم من 1 ≤ -12سنة.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات Sample Collection

تضمنت الدراسة الحالية فحص 300عينة غائط من الأطفال الذين يعانون من الإسهال و يشكون من آلام بطنية والمراجعين لمختبرات الاستشارية في مستشفى بنت الهدى ومستشفى محمد الموسوي وبعض المراكز الصحية في محافظة ذي قار للمدة من شهر ايلول 2015 لغاية شهر تشرين الثاني 2016 للفئات العمرية من 1≤- 12 سنة حصراً.

جُمعت عينات الغائط بأوعية بلاستيكية بحجم 20 مل تقريباً ذات فوهة عريضة، ومعقمة ذات غطاء محكم للمحافظة على رطوبة العينة ومنع جفافها في أحد جوانبها ملصق ورقي لتدوين رقم العينة واسم المريض وفحصت العينات خلال مدة لا تتجاوز نصف ساعة من الحصول عليها بالمجهر الضوئي للبحث عن الأطوار المتغذية و المتكيسة لطفيلي المتحولة والعينات موجبة الفحص المجهري

تم حفظها من دون إضافة مواد حافظة بدرجة حرارة - 20 م لحين بدء عملية استخلاص الـDNA منها وإخضاعها للفحوص الجزيئية.

الفحص المجهري للعينات Microscopic Examination

تم الفحص بطريقة المسحة الرطبة باستعمال المحلول الملحي وصبغة اليود كالاتي:

1- توضع قطرة من المحلول الفسلجي على طرف من الشريحة الزجاجية وقطرة من محلول اليود المائي على الطرف الاخر
2- اخذت كمية قليلة من الغائط من المناطق الحاوية على دم او مخاط بواسطة عيدان خشبية ومزجت جيداً مع المحلولين كلاً على حدا ووضع غطاء الشريحة
3- فحصت العينة تحت المجهر بقوة عدسة شيئية 10X و 40X , (Burnett and Crocker 2005).

الفحوص الجزيئية

اولاً استخلاص الحمض النووي من الغائط DNA Extraction of Stool

اجري استخلاص الحمض النووي من عينات الغائط للأطفال ،وذلك باستعمال عدة الاستخلاص الخاصة بالغائط (Stool Genomic DNA extraction kit) المجهزة من شركة Bioneer الكورية، واجري الاستخلاص حسب تعليمات الشركة.

ثانيا طريقة فحص PCR

اجري الفحص باستعمال البادئات الخاصة بجين 18S rRNA المسؤول عن تشخيص جنس المتحولة *Entamoeba* spp وانواعها *E.histolytica, E.dispar* بحسب طريقة (Khairnar and Parija, 2007) وكالاتي:

1- فحص PCR

أستخدم بادئ E-1E-2 لجين 18S rRNA الخاص بتشخيص جنس المتحولة *Entamoeba* spp. يعطي ناتج بحجم 888bp .

1 -1– تحضير مزيج تفاعل سلسلة متعدد البلمرة Primary PCR master mix

حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة باستعمال عدة KABA2G Robust HotStart Ready Mix (2x) المجهزة من شركة KAPA Biosystem الكندية وبحسب تعليمات الشركة كما في الجدول الاتي :

جدول(1): مكونات مزيج تفاعل سلسلة متعدد البلمرةPCR

PCR master mix	الحجم
المكون الاساسيmaster mix2X	12.5 µL
DNA template قالب الحمض النووي	4µL

forward primer البادئ الامامي	1.25µL
reverse primer البادئ الخلفي	1.25µL
PCR waterماء	6µL
المجموع	**25µL**

وضعت مكونات مزيج التفاعل في انابيب PCR ثم نقلت الى جهاز الطرد المركزي المازج Vortex ومزجت بعناية وبعدها نقلت الانابيب الى جهاز المدور الحراري PCR Thermocycler لإجراء حالات الدورات الحرارية .

2-1 برنامج الدورات الحرارية لتفاعل سلسلة البلمرةPCR Thermocycler Condition

اجري فحص PCR باستعمال جهاز PCR Thermocycler بحسب الظروف المبينة في الجدول (2)

جدول (2)الدورات الحرارية لتفاعل السلسة متعدد البلمرة PCR

PCR Step	Repeat cycle	Temperature(C)	Time
Initial denaturation	1	96	2min
Denaturation	30	92	60 sec.
Annealing		56	60 sec
Extension		72	90 sec
Final extension	1	72	7 min
Hold	**-**	**4**	**Forever**

2 فحص البلمرة المتسلسل المزدوج Nested PCR

أستخدم بادئ EH-1، EH-2 لجين 18S rRNA الخاص بتشخيص *Entamoeba histolytica*. يعطي ناتج بحجم 439bp .والبادئ ED-1, ED-2 الخاص بتشخيص *Entamoeba dipar* يعطي ناتج بحجم 174bp.

حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة باستعمال عدة KABA2G Robust HotStart Ready Mix (2x) المجهزة من شركة KAPA Biosystem الكندية وحسب تعليمات الشركة كما في الجدول (1) وكذلك بالنسبة للدورات الحرارية كما موضح بالجدول (2) باستثناء درجة حرارة Annealing التي اصبحت 48 درجة مئوية و أُخذ ناتج الدورة الاولى PCR Product

جدول (3) يمثل التسلسل النيوكليوتيدي للبادئات التي استعملت في تقنية Nested PCR

البادئ	عدد القواعد	التسلسل
E-1	20	F- TAA GAT GCA CGA GAG CGA AA
E-2	20	R- GTA CAA AGG GCA GGG ACG TA
EH-1	22	F- AAG CAT TGT TTC TAG ATC TGA G
EH-2	21	R- AAG AGG TCT AAC CGA AAT TAG
ED-1	21	F- TCT AAT TTC GAT TAG AAC TCT
ED-2	21	R- TCC CTA CCT ATT AGA CAT AGC

جدول(4) يمثل البادئات التي استعملت في تقنية Nested PCR مع المصدر وناتج فحص PCR

البادئ	الاستعمال	المصدر	ناتجPCR
E-1	تشخيص طفيلي *Entamoeba spp.*	(**Khairnar and Parija, 2007**)	888bp
E-2			
EH-1	تشخيص طفيلي *E.histolytica*	(**Khairnar and Parija, 2007**)	439bp
EH-2			
ED-1	تشخيص طفيلي	(**Khairnar and**	174bp

	Parija, 2007)	*E.dispar*	ED-2

3 – الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز Agarose Gel Electrophoresis

تم الكشف عن عينات الحمض النووي DNA المستخلص وناتج تقنية PCR باستخدام الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز agarose gel electrophoresis بحسب طريقة (Fallah *et al*., 2008)

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

حُللت نتائج الدراسة الحالية باستعمال اختبار مربع كاي (X^2) Chi –Square باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS (البلداوي ،2009).

النتائج

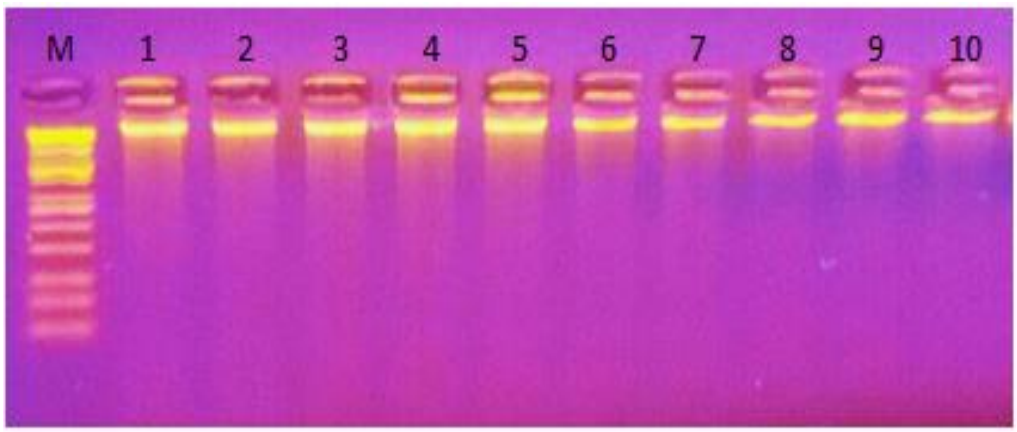
1_ الفحص المجهري Microscope Examination

تضمنت الدراسة الحالية فحص 300 عينة غائط باستعمال المسحة المباشرة الرطبة وطريقة التركيز وتبين ان 80عينة كانت تحتوي على الطور المتغذي او الطور المتكيس للطفيلي وبنسبة إصابة كلية 26.86 % كما في الجدول (5)

2 الفحوص الجزيئية Molecular Examination

2-1.أستخلاص الـ DNA من الغائط:

أثبتت طريقة الأستخلاص المستعملة في الدراسة الحالية أنها طريقة جيدة في الحصول على تركيز ونقاوة مناسبة لأستعمال الـDNA الناتج كقالب templet في تقنية الـ PCR من خلال الأستخلاص المباشر للـDNA من80 عينة غائط وكما في الصورة (1).



الصورة (1):الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز بتركيز1 % (120 V/45 Min)الاعمدة من (10 - 1) تمثل عينات الـDNA المستخلص M يمثل Ladder.

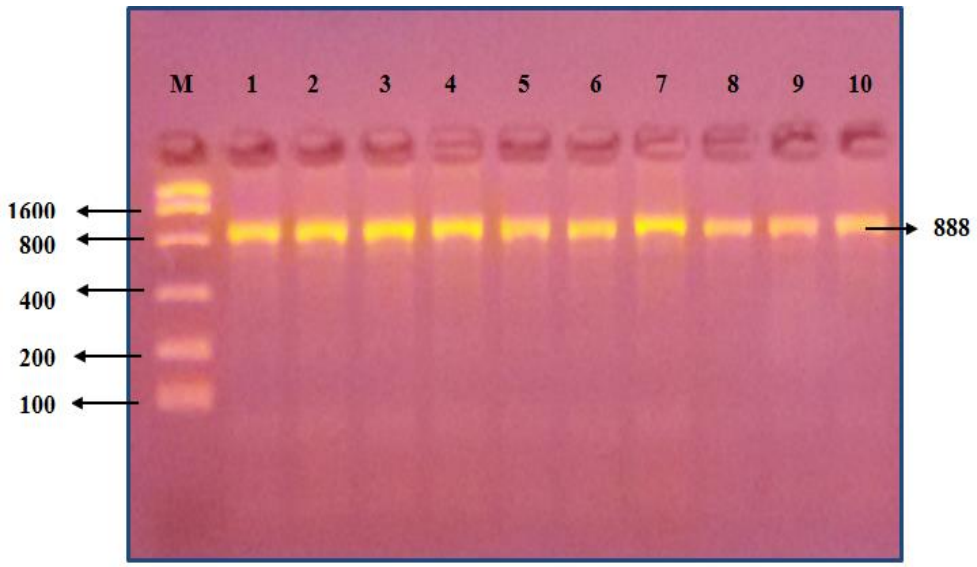
2-2 نسبة الاصابة بطفيلي *Entamoeba ssp.* باستعمال تقنية ال PCR

أظهرت الدراسة نسبة إصابة كلية 35 % عندما اجري فحص PCR اذ سجلت 28 عينة نتيجة موجبة بالفحص الجزيئي من 80 عينة كانت موجبة مجهرياً كما موضح بالجدول (5) و الصورة (2) .ولم تسجل الدراسة فرقا معنويا بين نسب الاصابة بالفحص المجهري والجزيئي عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$.

جدول (5) : نسبة الاصابة بطفيلي المتحولة باستعمال الفحصين المجهري والجزيئي.

الفحص	المجهري		الجزيئي	
	العدد	النسبة%	العدد	النسبة%
الموجب	80	26.86	28	35
السالب	220	73.14	52	65
المجموع	300	100	80	100

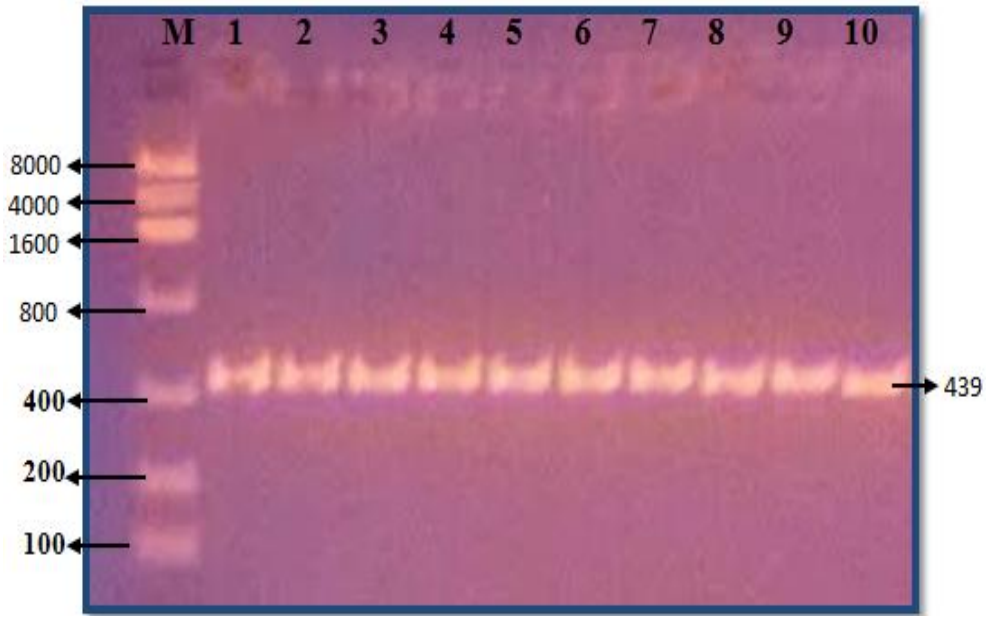
X^2 =1.49, P =0.28, d f =1



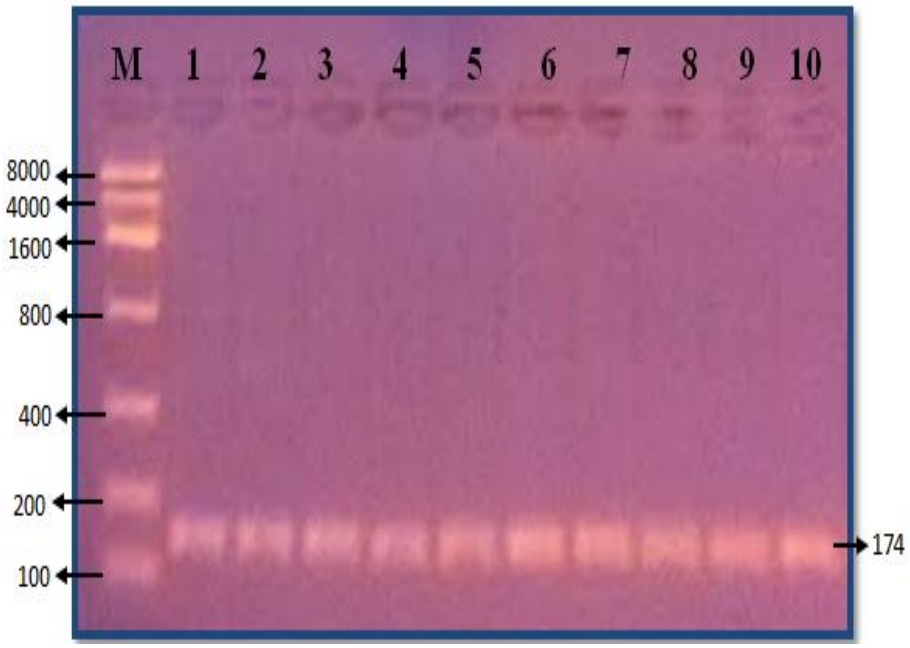
صورة (2) : الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز تركيز 2% لمدة 45 دقيقة (120V) لنواتج PCR لجين 18S rRNA (888bp) لطفيلي *Entamoeba* spp. مع صبغة الأثيديوم بروماید ، M تمثل الدليل الحجمي 100-8000 زوج قاعدي والاعمدة من 10 - 1 موجبة للطفيلي .

3-2- نسبة الاصابة بأنواع طفيلي المتحولة. باستعمال تقنية ال Nested PCR.

للتمييز والتعرف على نوع الطفيلي استعملت تقنية الNested PCR في فحص 28عينة كانت موجبة بفحص PCR فحصلت الدراسة على نسبة إصابة بطفيلي *E.histolytica* 39.29 % صورة (3) ونسبة إصابة بطفيلي *E.dispar* 39.29% صورة (4) جدول (5).



صورة (3) : الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز بتركيز 2% لمدة 45 دقيقة (120V) لنواتج PCR (439bp)لجين 18S rRNA لطفيلي *Entamoeba histolytica*. مع صبغة الأثيديوم بروماید ، M تمثل الدليل الحجمي 8000-100 زوج قاعدي والاعمدة من 10- 1 موجبة للطفيلي .



صورة (4) : الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز بتركيز 2% لمدة 45 دقيقة (120V) لنواتج PCR (174 bp)لجين 18S rRNA لطفيلي *Entamoeba dispar*. مع صبغة الأثيديوم بروماید ، تمثل الدليل الحجمي 8000-100 زوج قاعدي والاعمدة من 10- 1 موجبة للطفيلي .

جدول (6) نسبة الاصابة بأنواع المتحولة باستعمال تقنية الNested PCR

الفحص	Nested PCR	
نوع الطفيلي	العدد	النسبة %
E.histolytica	**11**	**39.29**
E.dispar	**11**	**39.29**
Entamoeba.spp	**6**	**21.43**
المجموع الكلي	**28**	**100**

X^2 =9.76, P =0.008, d f =2

المناقشة

1 – الفحص المجهري

توصلت الدراسة الحالية الى نسبة إصابة 26.86 % بجنس المتحولة باستعمال الطرائق المجهرية وكانت نتائج الدراسة الحالية تتفق مع ما توصل اليه الناصري (2007) حيث سجل نسبة اصابة 25.6 % في دراسته في مدينة كركوك وسجلت نسبة اقل مما توصل اليه Ismail (2006) في مدينة تكريت اذ توصل الى نسبة اصابة بلغت 47.7 % في الاطفال المصابين بالإسهال دون 12 سنة

بينما سجلت نتائج اعلى مما توصلا اليه Sultan and Al-Jobori (2005) في مدينة الكوفة اذ سجلا نسبة اصابة بلغت 10.9 %

ان الاختلاف في نسبة الاصابة بالطفيلي المسجلة في الدراسة الحالية مع الدراسات السابقة المذكورة اعلاه ربما يعود الى اختلاف الظروف المناخية والموقع الجغرافي والمدة الزمنية التي غطتها الدراسة (Nath *et al*., 2015) او ربما يعود الى الاختلاف في الكثافة السكانية والنظافة الشخصية والاختلاف في مستوى الصرف الصحي او قد يُعزى ظهور الاختلاف الى تعدد طرق وتقنيات الفحص ومدى دقة الفاحص واختلاف حجم العينات التي تطرقت لها الدراسة (Chavez, 2007).

تُعزى اوجه التشابه والتقارب بصورة عامة الى الانتشار الواسع للطفيلي وبساطة دورة حياته او بسبب طريقة انتقاله وعدم الالتزام بقواعد النظافة العامة ويمكن ان يُعزى التشابه الى تقارب الظروف المناخية للبلد عموماً كما ان رمي المياه الملوثة قبل معالجتها وعدم كفاءة تعقيمها ومقاومة الاطوار المتكيسة للطفيلي لعمليات تعقيم المتمثلة بالكلوره تعمل مجتمعة على زيادة الاصابة بالطفيلي (عبد النعيم، 2012).

2 – الفحص الجزيئي

2-1 نسبة الاصابة بطفيلي المتحولة *Entamoeba* Spp. باستعمال تقنية PCR

توصلت نتائج الدراسة الحالية الى نسبة اصابة كلية باستعمال الطرائق الجزيئية 35 % عند فحص 80 عينة كانت موجبة بالفحص المجهري ، اذ تبين ان 28 عينة كانت موجبة بالفحص الجزيئي حيث تتفق مع ما توصل اليه Dawah *et al*.(2016) في نيجيريا اذ سجل نسبة اصابة كلية 34.8 % عند فحص 46 عينة كانت موجبة للفحص المجهري تبين ان 16 عينة كانت موجبة لفحص Nested Multiplex PCR وكذلك قريبة مما سجله AL-Ebrahimi (2013) اذ سجل نسبة اصابة كلية 33.3 % في محافظة القادسية وكانت نتائج الدراسة الحالية اقل مما ذكره Zebardast *et al* (2014). اذ سجل نسبة اصابة بلغت 62.96 % في ايران كذلك اختلفت مع ما ذكره Anuar *et al* (2013). الذي سجل نسبة اصابة 67.7 % في ماليزيا في حين سجلت الدراسة نتائج اعلى مما ذكره Hussein (2011) اذ سجل نسبة اصابة بلغت 4 % في الضفة الغربية في فلسطين

قد يُعزى ظهور الاختلاف في نتائج الدراسة الحالية باستعمال تقنية PCR مع نتائج الدراسات السابقة الى الاختلاف في طرائق نقل وخزن عينات الغائط حيث ان حفظها بدرجة حرارة الغرفة يؤدي الى التحلل السريع للحمض النووي الذي يؤثر على حساسية اداء PCR او نتيجة لطول فترة الخزن وبالتالي فمن الضروري خزن العينات بدرجة حرارة 20°- او نتيجة لاستعمال مثبتات ومواد حافظة تتفاعل مع مكونات الخلية وتؤثر على DNA وتبين ان تجميد العينات هو افضل طريقة نظرا الى النتائج القابلة للتكرار(Lebbad and Svard, 2005) او قد يعزى الاختلاف في النتائج الى الاختلاف في طرائق استخلاص الحمض النووي من العينات او ربما نتيجة لاستعمال تقنيات PCR

مختلفة كذلك بسبب الاختلاف في عدد او كمية الطفيليات الموجودة في العينات (Parija *et al.*, 2014).

2-2- نسبة الاصابة بأنواع طفيلي المتحولة. باستعمال تقنية الNested PCR

توصلت الدراسة الحالية باستعمال فحص Nested PCR الى نسبة اصابة بطفيلي *E.histolytica* قُدرت 39.29 % والى نسبة اصابة بطفيلي *E.dispar* بلغت 39.29 % والى نسبة اصابة بانواع اخرى قدرت 21.43 % لم تحدد على وجه الدقة لعدم استعمال البادئات الخاصة بها.

كانت نتائج هذه الدراسة قريبة مما سجلته عبد النعيم (2012) التي ذكرت نسبة اصابة بلغت 50% بطفيلي المتحولة الحالة للنسج و 35 % بطفيلي المتحولة المتغايرة حيث استعملت طريقة PCR التقليدية لفحص عينات المرضى المراجعين لمستشفى جامعة الزقازيق في مصر وكانت اقل مما سجلته Kazamel(2013) بين المرضى المراجعين لمستشفى القصر العيني في مصر، اذ ذكرت نسبة اصابة بلغت 69.21% بطفيلي المتحولة الحالة للنسج و10.3% بطفيلي المتحولة المتغايرة بينما كانت اعلى مما سجله Ekou *et al* (2013). في اوغندا فقد توصل الى نسبة اصابة 7.31% بطفيلي المتحولة الحالة للنسج و 21.6% لانواع المتحولة الاخرى.

يعد استعمال الطرائق الجزيئية من افضل الطرائق المتبعة في تشخيص انواع جنس المتحولة وتمييز سلالات النوع الواحد وله الاثر الفعال في التشخيص الصحيح لداء الاميبات Amoebiasis وان وجود طفيلي المتحولة الحالة للنسج بنسبة عالية عموماً يؤكد القدرة الامراضية للطفيلي وهذا يتفق مع ما وجده El-Bakri *et al.* (2013) في حين ان النسبة العالية لطفيلي المتحولة المتغايرة يعكس ضراوة الطفيلي العالية وقابليته على احداث الاصابة حيث اظهرت دراسة اجراها Dawah *et al.*(2016) في نيجيريا تغلب وجود طفيلي *E.dispar*

سجلت نتائج الدراسة الحالية وجود 6 عينات وبنسبة 21.7% اعطت نتيجة سالبة للنوعين باستعمال Nested PCR اي انها تعود لانواع اخرى قد تكون *E.hirtmani* او *E.coli*

المصادر

البلداوي, عبد الحميد عبد المجيد (2009) . أساليب الإحصاء باستخدام برنامـــــج SPSS : صفحة442 .

الطرفي , زينب علي حسن (2014). دراسة عاملي الضراوة (EhCP1&EhCP5) وبعض التغيرات الدميَة والكيموحيوية المناعية للأشخاص المصابين بطفيلي الأميبا الحالة للنسيج في محافظة النجف الأشرف . أطروحة دكتوراه , كلية التربية للبنات , جامعة الكوفة : صفحة142.

الناصري ، مبدر عواد عبد (2007). دراسة وبائية عن أمراضية أميبا الزحار *Entamoeba histolytica* للأطفال المراجعين والراقدين من سن مابعد الولادة لغاية (12) عاماً في مستشفى بيجي العام وتأثير المستخلصات الكحولية والمائية لبعض النباتات عليها ، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة تكريت: صفحة 43-47 .

عبد النعيم , فاطمة أحمد (2012). دراسة تفريقية بين *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* باستخدام تقنية PCR . رسالة دكتوراة , جامعة الزقازيق , كلية الطب البشرى : الصفحة141.

Al-Ebrahimi, H. N. M. (2013). Detection of major virulence factors of *Entamoeba histolytica* by using polymerase chain reaction (PCR) Technique. MSc. Thesis, College Medicine University Al-Qadisiya:110 PP.

Anuar, T. S.; Al-Mekhlai, H. M.; Abdul Ghani, M. K. ; Siti, S. N.; Salleh , F. and Ghazali, N. (2013). Different Clinical Outcomes of *Entamoeba histolytica* in Malaysia. Korean Journal of Parasitology; 51(2):231-236 .

Bogitsh, B. J. and Carter, C. E. (2013). Human parasitology, Academic Press, Amsterdam; Boston, 55-58.

Burnett , D. and Crocker , J. (2005) . The science of laboratory diagnosis . 2nd edn. , John Wiley and Sons Ltd, England . pp:240.

Chavez, L. H. (2007). Amebiasis. Journal of biomedicine and Biotechnology.34(2) :242-254.

Davis, P. H.; Zhang, X.; Guo, J.; Townsend, R. and Stanley, S. L. (2006). Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. Molecular microbiology, 61(6), 1523-1532.

Dawah, I. S.; **Inabo, H. I.**; **Abdullahi, I. O. and Machido, A. D.** (**2016**). Differentiation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* from diarrhoeic stools using Polymerase Chain Reaction in Kaduna, Nigeria. International Journal of Medicine and Biomedical Research 5(2), 61-66.

Ekou, J.; Nakavuma, J. L.; Erume, J. and Ocaido, M. (2013). PCR detection of *Entamoeba histolytica* in microscopically positive stool samples of hospital patients in Soroti, eastern Uganda. African journal of Clinical and experimental Microbiology;14(1): 5-9.

El-Bakri, A.; **Samie, A.**; **Ezzedine, S. and Odeh, R.A.** (**2013**) Differential detection of *Entamoeba histolytica*, Entamoeba dispar and *Entamoeba*

moshkovskii in fecal samples by nested PCR in the United Arab Emirates (UAE). Acta Parasitological. 58(2): 185-190.

Fallah, E.; Nahavandi, K. H.; Jamali, R.; Poor, B. M. and Asgharzadeh, M. (2008). Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from human and animal reservoirs by PCR-RFLP. Journal of Biology Science. 14: 1-6.

Fallah, E.; Shahbazi, A.; Yazdanjoii, M. and Rahimi-Esboei, B. (2014). Differential detection of *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar* by parasitological and nested multiplex polymerase chain reaction methods. Journal of Analytical Research in Clinical Medicine. 2(1): 25-9.

Hamzah, Z.; **Petmitr, S.**; **Mungthin, M.**; **Leelayoova, S.** and **Chavalitshewinkoon-Petmitr, P.** (**2010**). Development of multiplex real-time polymerase chain reaction for detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in clinical specimens. The American journal of tropical medicine and hygiene. 83(4): 909-913.

Hussein , A. S.(2011). Prevalence of intestinal parasites among school children in northern districts of West Bank- Palestine. Tropical Medicine and International Health Journal. 16(2): 240–244 .

Ismail, A. M. (2006) . Diagnostic study of *Entamoeba histolytica/ Entamoeba dispar* and its relation with pathogenic bacteria causing diarrhea in children. Ph. D. Thesis, College of Medicine, Tikrit University.pp 167 .

Kazamel, R. A. (2013). Dignosis of *Entamoeba histolytica \dispar* using conventional and molecular techniques. MSc. thesis. Faculty of Medicine. Cairo University.122 pp.

Khairnar, K. and Parija, S. C.(2007). A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii* and *E .dispar* DNA in stool samples. BioMed Central of Microbiol. 7(1): 47.

Lebbad, M. and Svard, S.G. (**2005**) PCR differentiation of *Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar* from patients with amoeba

infection initially diagnosed by microscopy. Scandinavian journal of infectious diseases. 37(9): 680-685.

Marie, C.; **Verkerke, H. P.**; **Theodorescu, D.** and **Petri, W.A.** (**2015**). A whole-genome RNAi screen uncovers a novel role for human potassium channels in cell killing by the parasite *Entamoeba histolytica*. Scientific reports 5.

Nath, J.; **Ghosh, S.; Singha, B.** and **Paul, J.** (**2015**). Molecular epidemiology of amoebiasis: a cross-sectional study among North East Indian population. Public Library of Science, Neglected Tropical Diseases. 9(12): e0004225

Ngui, R.; Angal, L.; Fakhrurrazi, S.; Lian- Lim, A .; Ling-Lau, Y.; Ibrahim, J. and Mahmud, R. (2012). Differentiating *Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* using nested polymerase chain reaction (PCR) in rural communities in Malaysia. Parasite and Vector. 5(1):187.

Parija, S. C.; Mandal, J. and Ponnambath, D. K. (2014). Laboratory methods of identification of *Entamoeba histolytica* and its differentiation from look-alike *Entamoeba* spp. Tropical Parasitology. 4(2):90-95.

Roberts, L.; Janovy, J.; Schmidt, G. and Larry, S. (2009). Roberts' Foundations of Parasitology, McGraw-Hill, 109-111.

Sultan, B. A. and AL-Jeboori, N. H. (2005). Epidemiological and pathological association of parasitic appendicitis. Middle East Journal Family Medicine. (Abstract).

Weedall, G. and Hall, N. (**2011**) Evolutionary genomics of *Entamoeba.* Research in microbiology. 162(6): 637-645.

Zebardast, N.; Haghighi, A.; Yeganeh, F.; Tabaei, S.; Gharavi, J.; Fallahi ,S .; Zohreh, Z.; Salehi, N.; Taghipour, N.; Kohansal, C. and Farideh, F. (2014). Application of Multiplex PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii*. Iranian Journal of Parasitology. 9(4): 466-473 .

Molecular investigation of the Parasite *Entamoeba* Spp. among children with diarrhea in Thi Qar Province

Prof.Dr.
Fadhil Abbas Manshad Al–Abady

Manar Kareem Kadhm Al-Saidy

Abstract

The purpose of the current study is the genetic diagnosis of the genus *Entamoeba* Using PCR technology and identify some of the species that infect humans using Nested PCR by 18S rRNA gene responsible for this genus discrimination.

The current study included 300 Sample microscopically examined for a period for October 2015 to Septembre 2016 - turned out the presence total infection rate for *Entamoba* complex 26.86%. Eighty samples of microscopically positive were examined moleculary and affirmed the presence 35% of *Entamoba spp*.

When Nested PCR examination was used to determine the species (Species Specific) the infection rate 39.29% appeared to *Entamoeba histolytica* and 39.29% for *Entamoeba.*

The results of this study refer that the Nested PCR technique was efficiency in distinguishing and identifying species of the parasite with high accuracy and reliability, high-speed compared to microscopic examination is able to distinguish the species of *Entamoeba* and The high sensitivity of molecular ways help to reach the true prevalence of this genus and We can use these molecular methods in epidemiological studies.