*التحديد الجزيئي لسلالات طفيلي المشوكة الحبيبية في الإنسان وبعض المضائف الوسطية باستخدام تقنيةPCR

تاريخ الاستلام 2014/3/10 تاريخ القبول 2014/5/26

هادي مدول حمزة نور عايد مايع
Hadihamza519@yahoo.com Noorr803@yahoo.com

الخلاصة

تم جمع (18)عينة من الأكياس العدريه لإصابات الإنسان خلال مده الدراسة التي امتددت من تشرين الثاني 2012 ولغاية شهر تموز 2013 ,خلال إجراء العمليات الجراحية للمرضى المصابين حيث بلغت نسبة الإصابة 5.50%. .فحصت العينات السابقة باستخدام تقنية التفاعل التضاعف العشوائي المتعدد الإشكال (Random amplified polymorphic DNA (RAPD لتحديد التغاير الوراثي بين السلالات باستخدام ستة بادئات عشوائية هي(OPE – 07و OPF – 13 و OPF – 19 و OPC – 10 و OPF 16 -و OPA –01) . لبيان التغاير الوراثي بين العينات من خلال وجود أو عدم وجود حزم تسلسليه للحامض النووي DNA في العينات المدروسة وقد أظهرت البادئات مايأتي :-

ـ قدرة البادئ (OPE – 07)على تحديد البصمة الوراثية لعينات الحامض النووي DNA للأكياس العدرية المستأصلة من كبد الإنسان عند الوزن الجزيئي 400bpو500bp باعتباره مؤشرا وراثيا للعينات المستأصلة من كبد الإنسان ولم تظهر في عينات المضائف الأخرى .

ـ قدرة البادئ (OPF – 13) على تحديد البصمة الوراثية للحامض النووي DNA في الأكياس العدريه لكبد الإنسان عند الوزن الجزيئي 300bpو500bp حيث ظهرت في عينات الإنسان ولم تظهر في عينات المضائف الأخرى .

ـقدرة البادئ (OPC – 10) على تحديد البصمة الوراثية للحامض النووي DNA للأكياس العدريه لكبد الإنسان عند الوزن الجزيئي 900bp,700bp,600bp,500bp حيث لم تظهر العينات للمضائف الأخرى .

ـ عدم قدرة البادئ (OPF – 16 , OPA – 01, OPF – 19) على تحديد أي بصمة وراثية مشابه لقالبDNA في عينات الإنسان.

ـ قدرة البادئ (OPE – 07) على تحديد البصمة الوراثية للحامض النووي DNA في الأغنام عند الوزن الجزيئيbp500,bp300,bp200 وفي الأبقار عند الوزن الجزيئي 500bp ولم يتمكن من تحديد أي بصمه وراثية في الجمال وبهذا تعد هذه البصمات الوراثية هي بصمات خاصة بهذه المضائف فقط يمكن من خلالها تمييزها عن غيرها من العينات المدروسة الأخرى .

ـ قدرة البادئ (OPF – 13) على تحديد البصمة الوراثية للحامض النووي DNA والمستاصله من كبد الأغنام عند الوزن الجزيئي 400bp, 300bp,200bp, وفي الأبقار ,700bp,600bp,200bp ولم يتمكن من تحديد أي بصمه وراثية في عينات DNAللأكياس العدرية المستاصلة من الجمال.

ـ قدرة البادئ (OPF – 19) على تحديد البصمة الوراثية للحامض النووي DNA للأكياس العدرية المستاصلة من كبد الأغنام عند 500bp وللأبقار عند الوزن الجزيئي 300bpو500bp والجمال عند 1300bp.

كلمات مفتاحية: التغاير الوراثي,الاكياس العدرية,البصمة الوراثية,تفاعل التضاعف العشوائي متعدد الاشكال

ـقدرة البادئ (OPC – 10) على تحديد البصمة الوراثية في الجمال عند 1300bp ولم يتمكن من تحديد أي بصمة وراثية في الأبقار والأغنام .

ـ قدرة البادئ (OPF_ 16) على تحديد البصمة الوراثية للحامض النووي للأكياس العدريه في الأغنام عند الوزن الجزيئي 300bp,400bp,500bp والأبقار عند 300bp والجمال عند 500bp 600bp.

أخيرا أظهرت الدراسة إن السلالات التي تصيب الإنسان قد تأتي من الأغنام والأبقار حصرا لوجود بصمات وراثية مشتركه بينهم يمكن الكشف عنها باستخدام البادئين OPE – 07 عند الوزن الجزيئي 500bp و OPF – 13 عند الوزن الجزيئي 300bp فقط ولكن هذا يحتاج إلى دراسة أوسع باستخدام التتابع الجيني Gen sequences ولجميع الحيوانات الأليفة الأخرى القريبة من الإنسان.

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

Microbiology Classification Q_1R_1 74.5

المقدمة

مرض الأكياس العدرية من الإمراض الانتقالية الواسعة الانتشار في العالم ,إذ يعد من الإمراض فوق المتوطنة التي تحدث الإصابة عن طريق الطور اليرقي لطفيلي المشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus* (1) ويعد من الإمراض ذات الأهمية الطبية الواسعة الانتشار في القطر وخصوصا في المناطق الريفية والتي يكون الاتصال مقرب بين المضيف النهائي (definitive host) المضائف الوسطية من مختلف الحيوانات (2) ,وأن لهذا المرض أهمية صحية واقتصادية كبيرة كونه يصيب أعضاء مهمة من الإنسان والحيوان مثل الكبد, الطحال و الكلية وكذلك الأعضاء التي من الصعوبة علاجها وهي العمود الفقري والدماغ والأوعية الدموية (3).أن تقنيه التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال RAPD هي أحدى التقانات المعتمدة على استخدام تفاعل البلمره التسلسلي PCR التي استخدم بصورة واسعة بوصفه مؤشرا جزيئيا منذ عام 1990 وقد طورت اختبار التضاعف العشوائي (RAPD) مجموعتين المجموعة (A) في (Wilimngton -u) (Dpoont co) أطلقت على الطريقة الجديدة تسمية اختبار (RAPD) التفاعل العشوائي المتعدد الإشكال لسلسلة ألدنا (4) ووصفت أنها تطبيقات الخريطة الجينية (Gene map) أما المجموعة الأخرى (B) في معهد كاليفورنيا للأبحاث الحيوية في الولايات المتحدة الأمريكية (5) وكذلك البصمة المجين (DNA finger printing) وجمع اختبارهم أنشاء بادئ عشوائي للتفاعل التضاعفي لسلسة ألدنا(AP ACR) (Ar bitrary primer) كلا هذين الاختبارين اعتمدا على ملاحظة تلك القطع الصغيرة المفردة من النيوكليوتيدة منقوص الاوكسجين للتابع المختار بصورة عشوائية عندما مزجت من ألدنا المجين والقواعد النيوكليوتيدة الأربعة (dntps) والدارئ وإنزيم البلمرة ألدنا وإخضاعها لحرارة المبلمر الحلقي ومضاعفة بعض قطع ألدنا (6) وان تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الإشكال(RAPD) أصبح لها أهمية كبيرة في الوقت الحاضر وذلك بسب كفاءتها وسرعتها في الكشف عن التباينات بين الإفراد والضروب فضلا عن استخدامها بادئات عشوائية قصيرة وهي عامة لكل الكائنات لذا أصبح ممكن تطبيقها على مدى واسع من الكائنات الحية مثل الإنسان(7) والحيوان (8) والنبات (9) والطفيليات(10) ويعود الاستخدام الواسع لهذه التقنية في هذا المجال لأنها أكفأ من المؤشرات الإنزيمية و تقنيه التقييد الشكلي للأطوال الجزيئية ألـ(RFLP)(Restriction fragment length polymorphism) في الكشف عن التباينات الوراثية وبالتالي بناء الخرائط الوراثية والتشخيص آذ استخدم تفاعل التضاعف العشوائي المتعدد الإشكال (RAPD) في تشخيص نمط معين من طفيلي *Lishmania donovani* (11) وأيضا تحديد البصمة الوراثية لطفيلي *Neospora oaninum* (12) وكذلك لطفيلي .*Echinococcus* sp (13) (14) (15) وقد أمكن بواسطة تقانة ال (RAPD) التميز بين اصناف طفيلي *Echinococcus* والمعزولة من المضائف الوسطية المختلفة التي تصيب الانسان والحيوانات الداجنة وكذلك دراسة العلاقات لوراثية بينهافوجد انها ذات تباينات وراثية (16)وفي دراسة حديثة امكن بواسطة استخدام بادئ (OPA-800) تشخيص طفيلي اللشمانيا (Old world lishmania)(lishmania donovani)(11) من أصل أربع بادئات عشوائي استخدمت في تحليل ألدنا المعزول من طفيلي في تفاعل ألـ(Rpad) وفي (OPA1)(OPAI-800) (OPAI-400)(OPAI-1200) التي تعود إلى وجود تكرار قصير للدنا للأنواع المختلة معتمدا على منتصف الطرف 3للبادئ (OPAI).

المواد وطرق العمل:

تم جمع نماذج الأكياس العذرية للإنسان والبالغة 18عينه من المستشفيات في مدينة الديوانية \صالة العمليات للفترة الدراسية بين تشرين الثاني لعام 2012 ولغاية شهر تموز 2013 بينما جمعت الأكياس العذرية من الحيوانات من أصل أغنام و أبقار وجمال من مجزرة الديوانية في محافظة الديوانية لنفس المدة والبالغ عددها 24 عينه حيث جمعت الأكياس العدرية بحاويات مبردة من الفلين ثم نقلت إلى المختبر في قسم علوم الحياة وأجريت عليها معاملات التهيئة والتحضير لفصل الرؤيسات الأولية والطبقة المولدة حيث استخدمت طريقة (17) اذعقم السطح الخارجي بالكحول بتركيز (70%) ولقد استخدمت محاقن طبية نبيذه بحجم (10) ملم وسحب السائل العدري بعد تعقيم الإبرة بالحرارة وذلك لكي لاتتلوث منطق السحب ,ثم ازليت الطبقة المولدة ووضعت بقناني زجاجية وحفظت بـ(70% Ethanol) وبدرجة حرارة منخفضة اربعة مؤية .

أستخلصت المادة الوراثية DNA من عينات المرضى المصابين وذلك بأستعمال AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit حسب تعليمات الشركة المصنعة و تم تحضير هذه التفاعلات بالاستناد على (5) ولقد استخدمت ستة بادئات عشوائيه تم تصميمها وتجهيزها من قبل شركه بايونير الكوريه تم اجراء فحص الـ RAPD لعينات الحامض النووي DNAحيث تم استخدام عدة Accupower® premixPCR kit

و بحسب تعليمات الشركة حيث تم وضع المزيج في أنابيب ال PCR والمجهزة في العدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة وأضيفت المكونات الاخرى لمزيج التفاعل (Primers,3 µL / DNA ,10 µL/ PCR water,7 µL) ثم تغلق الانابيب وتمزج بواسطة جهاز المازج وتنقل الانابيب لجهاز المبلمر الحراري الحلقي PCR Thermocycler لبدا التفاعل التضاعفي وفق البرنامج الاتي :- دورة واحده لمده 2 دقيقةعلى درجة حرارة 94للمسخ الاوليلشريط الدنا.40 دورة تضاعف لمدة 2 دقيقه على درجة حرارة\ 92 م لمسخ القالب ودقيقة واحدة على درجة حرارة 37م لربط البادئات بالدنا القالب 2 دقيقة على درجه حراره 72م لاستطاله البادئاتالمرتبطة بدورة اخيره واحدة للاستطالة لمدة 10 دقايق وبدرجة حرارة 72م بوصفها دورة اخيرة للاستطالة النهائية ,بعد ذلك أجري الترحيل الكهربائي لنواتج التضخيم على هلام الاكاروز بنسبة 1.5 % وبعد أكتمال عملية الترحيل الهلام الحاوي على ناتج بأستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV .

النتائج والمناقشة

نتائج فحص تقنية التفاعل التضاعفي العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الحامض النووي Random amplified (RAPD)polymorphic DNA.

الإنسان Human

تم فحص العينات ألموجبه المأخوذة من الإنسان لثماني عينات باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي العشوائي المتعدد الأشكال(RAPD) للحامض النووي ألدنا المستخلص من الطبقة الجرثومية لكبد الكيس العدري من المرضى المشمولين بالدراسة وباستخدام ستة بادئات تم تجهيزها من قبل شركة Geneaid الكورية وهي (**OPE – 07 وOPF 13 –و OPF – 19 و OPC – 10 و OPF 16 OPA – 01**).وتحت الشروط القياسية للتفاعل وتم تكرار التفاعل أكثر من مرة للوصول إلى الظروف القياسية المثلى لتفاعل التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال (RAPD) واعتمادا على الدراسات السابقة حول الموضوع وذلك من اجل دراسة التباينات الوراثية بين العينا ت المفحوصة وإمكانية إيجاد البصمة الوراثية المميزة لكل نوع , أظهرت نتائج استخدام البادئات المذكورة آنفاً في تفاعل التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال(RAPD)وجود اختلافات في البادئات في إنتاج الحزم المتضاعفة للتفاعل واختلاف في الأوزان الجزيئية وهو بدوره ناتج عن الاختلاف في المواقع المكملة للبادئ أذ لوحظ ان تلك البادئات توزعت إلى مجموعتين النوع الاول هو البادئات التي لم تظهر أي نتائج على هلام الاكاوروز وهي البادئ (**OPA – 01**) فقط والمجموعة الثانية شملت البادئات التي أعطت ناتج تضاعف على هلام الاكاروز وهي(**OPE – 07, OPF – 13 - , OPF – 19 , OPC – 10 , OPF 16**) وكما مبين في الشكل (1) ويعود السبب في عدم إعطاء المجموعة الأولى من البادئات في نتائج تضاعف في هذه التقنية إلى عدم وجود المواقع المكملة لتسلسل البادئ المستخدم ضمن(DNA)وبذلك لايحصل أي ارتباط بين البادئ المستخدم وشريط قالب DNA Tamblet (15.).

- البادئ(OPE – 07)

اظهر هذا البادئ أربع حزم تضاعفية بالوزن الجزيئي(700 600, 500,400,300) زوج قاعدي في حين لم يظهر أي حزم تضاعفية في الاوزان الجزيئية (-200 100)زوج قاعدي وكذلك في الأوزان الجزيئية (-1300 800)زوج قاعدي وكما في الشكل (1),ومن خلال الحزمة ذات الوزن الجزيئي300-700 يمكن تشخيص العينة عن العينات الأخرى باستخدام هذا البادئ لأنها تعد مؤشرا وراثيا (OPE – 07 700-300bp) حيث تمكن هذا البادئ من تحديد البصمة الوراثية (figer pritting) بطريقة المقارنة مع حزمة المؤشر (marker band) لهذه العينة لتشابه موقعها مع عينة DNA القالب(18).

- البادئ(OPF – 13)

اظهر هذا البادئ خمس حزم تضاعفية في العينات المأخوذة من الأكياس العدرية من كبد الإنسان وتراوحت أوزانها الجزيئية مابين (250-650) زوج قاعدي الشكل(1) والحزمة الأولى كانت بالوزن الجزيئي 250 زوج قاعدي والثانية 300 زوج قاعدي والثالثة 500 زوج قاعدي والرابعة 650 زوج قاعدي والخامسة 750 زوج قاعدي ومن خلال هذه الحزمة أيضا يمكن تشخيص العينة من بين العينات الأخرى لأنها تعد مؤشرا وراثيا(**OPF – 13 400bp**)لهذه العينة وان هذا البادئ له القدرة أيضا على تحديد البصمة الوراثية للأكياس العدرية بطريقة حزمة المؤشر لتشابه موقعها مع موقع DNA القالب (18)(10),وتتفق الدراسة مع دراسة (19)في العراق حيث أن الحزم ذات الوزن الجزيئي(300-540-750)زوج قاعدي قد ظهرت في العينات المأخوذة من الإنسان من المناطق الوسطى والجنوبية فقط ولم تظهر في العينات المأخوذة من المناطق الشمالية.

- البادئ (OPA – 01)

لم يظهر هذا البادئ أي حزم تضاعفية في الأوزان الجزيئية المختلفة مع عينات الحامض النووي DNA المأخوذة من الأكياس العدريه المأخوذة من كبد الإنسان وكما مبين في الشكل(1) ومن هذا يظهر عدم وجود علاقة بين الحزم الناتجة من تفاعلات التفاعل التضاعفي العشوائي(RAPD) وبنسبة الـ(كوانين- سايتوسين) في البادئات وهذه النتيجة تتفق مع (20)والذي بين أنه لاتوجد علاقة بين البادئ (عدد الحزم الناتجة من استخدامة)وبنسبة الـ كوانين- سايتوسين في حين لاتتفق مع (21)والذي ذكر بأن كفاءة البادئ المستخدم في تفاعلات التفاعل التضاعف العشوائي (RAPD)تزداد بزيادة نسبة كوانين- سايتوسين عند الاخذ بنظر الاعتبار أن عدد الأواصر التي ترتبط الكوانين الى السايتوسين هي ثلاثة في حين أن اصرتين فقط تربطان Alanineمع Thymine وبذلك فان الارتباط يكون أقوى بين البادئ وموقعة المكمل على قالب ألدنا ولارتباط عدد الحزم الناتجة بعدد مواقع الارتباط فيزداد عدد القطع المتضاعفة تبعا لذلك. وان عدم ملاحظة وجود علاقة بين نسبة الكوانين- السايتوسين وكفاءة البادئ المستخدم في هذه الدراسة يعود ربما إلى أن الارتباط الأقوى للبادئ لايؤدي بالضرورة إلى زيادة عدد مواقع الارتباط التي تكون ثابتة في النوع الواحد.

- البادئ(OPF – 19)

اظهر هذا البادئ ثلاث حزم تضاعفية مع عينات الحامض النوويDNA المأخوذة من الأكياس العدرية لكبد الإنسان تراوحت أوزانها الجزيئية ما بين 350-550 زوج قاعدي الشكل(1) وهذا يشير لعدم كفاءة هذا البادئ المستخدم وعدم وجود علاقة بين نسبة كوانين- سايتوسين أو ربما يعود إلى نوع الارتباطات التي تكون ثابتة في النوع الواحد ومن هذا يظهر عدم وجود علاقة بين الحزم الناتجة من تفاعلات التفاعل التضاعفي العشوائي المتعدد الاشكال الـ(RAPD) وبنسبة الكوانين –السايتوسين في البادئات وهذه النتيجة تتفق مع (20)والذي بين أنه لاتوجد علاقة بين البادئ وبنسبة كوانين –سايتوسين في حين لاتتفق مع (21) والذي ذكر بأن كفاءة البادئ المستخدم في تفاعلات التفاعل التضاعفي

العشوائي المنفرد المتعدد الإشكال (RAPD)تزداد بزيادة نسبة كوانين - سايتوسين عند الأخذ بنظر الاعتبار أن عدد الأواصر التي تربط الكوانين الى السايتوسين هي ثلاثة في حين أن اصرتين فقط تربطانAlanine وThymine وبذلك فان الارتباط يكون أقوى بين البادئ وموقعه المكمل على قالب ألدنا ولارتباط عدد الحزم الناتجة بعدد المواقع الارتباط فيزداد عدد القطع المتضاعفة تبعا لذلك. (21).

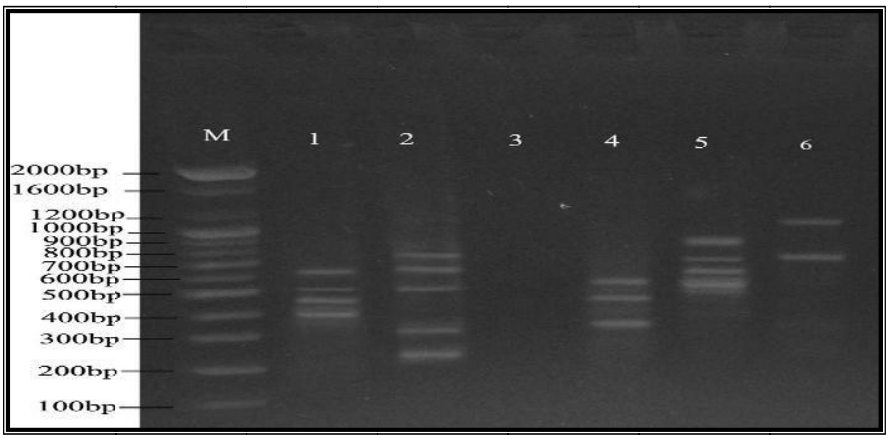
ـ البادئ (OPC – 10)

أظهر هذا البادئ أربع حزم تضاعفية في الأوزان الجزيئية 500-900 زوج قاعدي في حين لم يظهر أي حزم تضاعفية مع الأوزان الجزيئية 100-450 زوج قاعدي وكذلك الأوزان الجزيئية 950-1300 زوج قاعدي كما في الشكل (1)نستنتج من هذا ان هذا البادئ استطاع من تحديد البصمة الوراثية بطريقة حزمة المؤشر عند الوزن الجزيئي 500و600 و700 وزن قاعدي تشابه موقع الحزمة مع موقع حزمة الحامض النووي(DNA) القالب (19).

-البادئ(OPF – 16)

أظهر هذا البادئ حزمتين تضاعفيتين من عينات الحامض النوويDNA المأخوذة من الأكياس العدرية لكبد الإنسان تراوحت أوزانها الجزيئية مابين 750-1100 زوج قاعدي كما في الشكل (1) ومن هنا نستنتج عدم وجود علاقة بين الحزم الناتجة من تفاعل التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال الـ(RAPD) ونسبة الكوانين-السايتوسين في البادئ المستخدم (10) ومن خلال ما تقدم يمكن اعتبار الحزمة ذات الوزن الجزيئي500 زوج قاعدي التي ظهرت في العينات باستخدام البادئات (OPF – 13 (500)(OPE – 07(400 bp bp(bp OPC – 10(700,600,500) .مؤشرا وراثيا لعينات الحامض النووي الـDNA المأخوذة من الأكياس العدرية للإنسان كمضيف وسطي لتميزها عن باقي العينات الأخرى باستخدام نفس البادئات حيث تمكنت هذه البادئات من تحديد البصمة الوراثية بطريقه المقارنه مع حزمه المؤشر لهذه العينه لتشابها مع عينه القالب الدنا كما في الشكل (1)يوضح فية نوع البادئ وعدد الحزم والأوزان الجزيئية للأكياس العدرية المستأصلة من كبد الإنسان

الشكل (1)يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز 1.2الماخوذة من الاكياس العدرية المستأصلة من كبد الانسان باستخدام البادئات.



ـالعينات من 1-6 تمثل الحزم الموجبه باستخدام البادئات الست .
ـ العينه 3 تمثل العينه السالبه باستخدام البادئ **OPA – 01** .
1)تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPE – 07** .
2) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPF – 13** .
3) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPA – 01** .
4) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPF – 19** .
5) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPC – 10** .
6) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPF - 16** .

m- المؤشر
الأغنام Sheep

- البادئ (OPE – 07)

اظهر هذا البادئ أربع حزم تضاعفية من عينات الحامض النووي(DNA) المأخوذ من الأكياس العدرية لكبد الأغنام وتراوحت أوزانها الجزيئية مابين 200-550 زوج قاعدي في حين لم يظهر أي حزم تضاعفية في الأوزان الجزيئية 100-600-1300 وزوج قاعدي كما في الشكل(2) وتمكن هذا البادئ من تحديد البصمة الوراثية للعينات عند الوزن الجزيئي 200bpو 300bp باعتبارها مؤشرا وراثيا (OPE 07 200bp,300b –بطريقه حزمه المؤشر لتشابه موقعها مع موقع الدنا القالب(10).

- البادئ(OPF – 13)

اظهر هذا البادئ أربع حزم تضاعفية في الأوزان الجزيئية 750,400,300,200 زوج قاعدي ولم يظهر أي حزم تضاعفية في الأوزان الجزيئية الأخرى الشكل (2)وهذا يدل على وجود علاقة بين نسبة الكوانين ـ السايتوسين والبادئ المستخدم في الدراسة تمكن من تحديد البصمة الوراثية للعينات عند الوزن الجزيئي 400,300,200 زوج قاعدي لتشابه موقعها مع موقع قالب ألدنا (18).

- البادئ (OPA – 01)

اظهر البادئ خمس حزم تضاعفية مع الأوزان الجزيئية 250-850 زوج قاعدي وأوزانها الجزيئية هي -700-850 250-350-600 زوج قاعدي ولم يظهر أي تضاعف في أوزان الجزيئية 100-250 وكذلك 900-1300 زوج قاعدي ولم يظهر أي حزم عند الوزن الجزيئي 100-200 زوج قاعدي كما في الشكل(2) وهذا يدل على عدم وجود علاقة بين نسبة الكوانين ـ السايتوسين والبادئ المستخدم في الدراسة حيث أن الارتباط القوي لايؤدي بالضرورة إلى زيادة عدد مواقع الارتباط (21) وتمكن البادئ من تحديد البصمه الوراثية عند الوزن الجزيئي 700bp600bp لتشابه موقعها مع الدنا القالب(18).

- البادئ (OPF – 19)

اظهر هذا البادئ حزمة تضاعفية واحدة فقط من الوزن الجزيئي 500 زوج قاعدي ولم يظهر أي حزم تضاعفية عند الأوزان الجزيئية الأخرى الشكل (2) إن هذه الحزم التي ظهرت في العينات المأخوذة من كبد الأغنام فقط تعطي مؤشرا وراثيا يمكن من خلاله تميز هذه العينات عن العينات الأخرى باستخدام البادئ (OPF – 19 500bp).

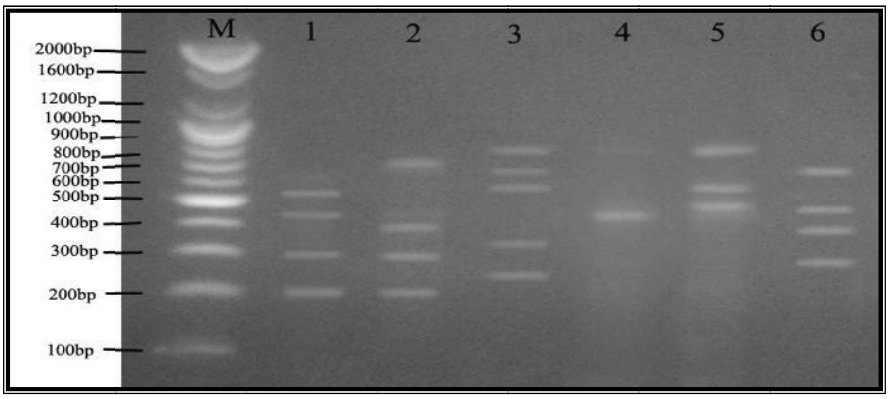
- البادئ(OPC – 10)

اظهر البادئ ثلاث حزم تضاعفية في الأوزان الجزيئية 550 زوج قاعدي و650 زوج قاعدي و950 زوج قاعدي في حين لم يظهر أي حزم تضاعفية في الأوزان الجزيئية الأخرى وهذا يدل على عدم وجود علاقة بين نسبة الكوانين ـ السايتوسين والبادئ المستخدم في الدراسة أذ أن الارتباط القوي لايؤدي بالضرورة إلى زيادة عدد مواقع الارتباط (21).

- البادئ (OPF – 16)

أظهر هذا البادئ أربع حزم تضاعفية في الأوزان الجزئية 300 زوج قاعدي و400 زوج قاعدي 50 زوج قاعدي و 750 زوج قاعدي ولم تظهر أي حزم تضاعفية في الأوزان الجزيئية 100-200-1300 زوج قاعدي وقد تمكن هذا البادئ من تحديد البصمة الوراثيه للعينات عند الوزن الجزيئي ,500bp,400bp, 300bpلتشابه موقعها مع دنا القالب وبهذا يمكن تشخيص العينات بآستخدام هذا البادئ عند (OPF-16300bp,400bp500bp) بطريقه المقارنة مع حزمة المؤشر (18).

الشكل(2) يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز 1.2الماخوذة من الاكياس العدرية المستأصلة من كبد االاغنام .



ـالعينات من 1-6 تمثل الحزم الموجبه باستخدام البادئات السته .

1)تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPE – 07** .

2) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPF – 13** .

3) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPA – 01** .

4) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPF – 19** .

5) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPC – 10** .

6) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ**OPF - 16**

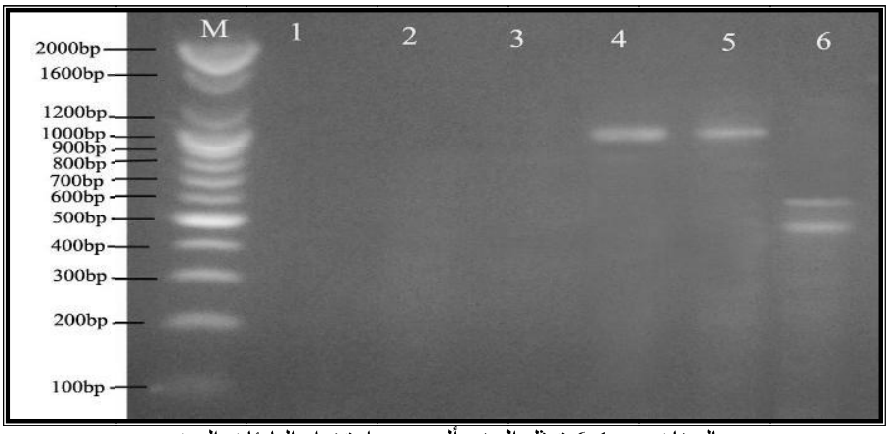
m- المؤشر

الجمال Gamal

لم تظهر البادئات OPE – 07 و OPA – 01و OPF

13 –أي حزم تضاعفية مع عينات الحامض النووي(DNA) للأكياس العدرية المأخوذة من الجمال في حين اظهر البادئان OPF – 19 و OPC – 10 حزمة تضاعفية واحدة لكل منهما عن الوزن ألجزيئيي أعلى من 1300 زوج قاعدي إما البادئ OPF – 16 فقد اظهر حزمتين تضاعفيتين عن الوزن الجزيئي 500-600 زوج قاعدي فقط ولم تظهر أي حزم تضاعفية عن بقية الأوزان الجزيئية الشكل(3) ومن هذا نستنتج ان البادئ OPF – 16 استطاع أن يحدد البصمة الوراثية بوجود الحزم -600 500و المعزولة من الحامض النووي DNA لعينات الأكياس العدرية المستأصلة من كبد الجمال وتمكن البادئ . – **OPF 19, OPC – 10** من تحديد البصمة الوراثية بوجود الحزمة 1300lp لكلا البادئين لتشابه موقعها مع ألدنا القالب(18).

الشكل(3) يمثل نواتج التضاعف للحامض النووي ألدنا على هلام الاكاروز (بتركيز2 -1)المأخوذة من الأكياس العدرية المستأصلة من كبد الجمال .



ـالعينات من 1-6 تمثل الحزم ألموجبه باستخدام البادئات الست.
- العينات1-3 تمثل العينات ألسالبه .
1)تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPE – 07** .
2) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPF – 13** .
3) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPA – 01** .
4) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPF – 19** .
5) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPC – 10** .
6) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ**OPF - 16**

ـm المؤشر

الأبقار Caws

ـ البادئ(OPE – 07)

أظهر هذا البادئ أربع حزم تضاعفية لعينات الحامض النووي ألدنا المأخوذ من كبد الأبقار المصابة بالأكياس العدريه تراوحت أوزانها الجزيئية بين 250-500 زوج قاعدي وهي 250 زوج قاعديا و 350 زوج قاعدي و 420 زوج قاعدي و500 زوج قاعدي الشكل (4) ومن خلال ألحزمه 500 زوج قاعدي يمكن تشخيص العينة المأخوذ من الأبقار عن العينات الأخرى باستخدام هذا البادئ لأنها تعد مؤشرا وراثيا (OPE – 07 500bp) حيث تمكن هذا البادئ من تحديد البصمة الوراثية بطريقه المقارنة مع حزمه المؤشر لهذه العينة لتشابها مع عينه قالب DNA (18).

ـ البادئ (OPF – 13)

أظهر هذا البادئ ستة حزم تضاعفية تراوحت ما بين 200 زوج قاعدي -700زوج قاعدي وهي 700,600,450,350,270,200زوج قاعدي الشكل (4)ومن خلال ألحزمة 700,600,200 زوج قاعدي يمكن تشخيص العينة الماخوذه من الأبقار عن باقي العينات بآستخدام هذا البادئ **200,600,700 (OPF – 13 pb)**باعتبارها مؤشراً وراثياً حيث تمكن من تحديد البصمة الوراثية للعينة بالمقارنة مع DNA القالب (18).

ـ البادئ (OPA – 01) أظهر هذا البادئ حزمتين تضاعفيتين فقط هما 350,220,زوج قاعدي ا وهذا يظهر عدم وجود علاقة بين الحزم الناتجة من تفاعلات التفاعل التضاعفي العشوائي RAPD ونسبه الكوانين – السايتوسين بآستخدام هذا البادئ وهذه النتيجة تتفق مع (20) والذي بين أن لاتوجد علاقة بين البادئ (عدد الحزم الناتجة من استخدامه)وبنسبة الـ (كوانين- سايتوسين) في حين لاتتفق مع (18)والذي ذكر بأن كفاءة البادئ المستخدم في تفاعلات التفاعل التضاعف العشوائي (RAPD)تزداد بزيادة نسبة كوانين- سايتوسين عند الأخذ بنظر الاعتبار أن عدد الأواصر التي ترتبط الكوانين إلى السايتوسين هي ثلاثة في حين أن اصرتين فقط تربطان الالنين مع الثايمين وبذلك فان الارتباط يكون أقوى بين البادئ وموقعة المكمل على قالب ألدنا ولارتباط عدد الحزم الناتجة بعدد مواقع الارتباط فيزداد

عدد القطع المتضاعفة تبعا لذلك. وان عدم ملاحظة وجود علاقة بين نسبة الكوانين- السايتوسين وكفاءة البادئ المستخدم في هذه الدراسة يعود ربما إلى أن الارتباط الأقوى للبادئ لايؤدي بالضرورة إلى زيادة عدد مواقع الارتباط التي تكون ثابتة في النوع الواحد.

ـ البادئ(OPF – 19)

أظهر هذا البدئ ثلاث حزم تضاعفيه هي 250 و300 و 500وزوج قاعدي من خلال الحزمة و300 زوج قاعدي و 500زوج قاعدي يمكن تشخيص العينة عن العينات الاخرى باستخدام هذا البادئ لانها تعد مؤشراً وراثياً(OPF-19 300,500Pb)حيث تمكن هذا البادئ من تحديد البصمة الوراثية. وهذا يتفق مع (19) .

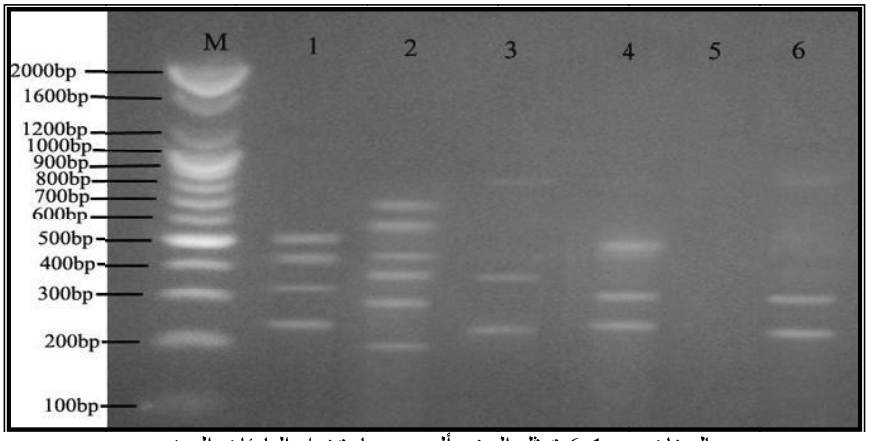
ـ البادئ (OPC – 10)

لم يظهر هذا البادئ أي حزم وراثيه مع العينات المفحوصة مما يدل على عدم وجود علاقة الكوانين - السايتوسين والبادئ المستخدم في الدراسة أذ أن الارتباط القوي لايؤدي بالضرورة إلى زيادة عدد مواقع الارتباط (21)

ـ البادئ(OPF – 16)

أظهر هذا البادئ حزمتين تضاعفيتين من 250 زوج قاعدي و300 زوج قاعدي ومن هنا يظهر وجود علاقة بين الحزم الناتجة من تفاعلات الـ RAPD ونسبة الكوانين – السايتوسين في هذا البادئ عند الوزن الجزيئي 300bp و**300bp (OPF- 16)** لتشابه موقعها مع الدنا القالب (18).

الشكل(4) يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز 1.2المأخوذة من الأكياس العدرية المستأصلة من كبد الأبقار .



ـالعينات من 1-6 تمثل الحزم ألموجبه باستخدام البادئات الست .
- العينة 5تمثل العينة ألسالبه للفحص
1)تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPE – 07** .
2) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPF – 13** .
3) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPA – 01** .
4) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPF – 19** .
5) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ **OPC – 10** .
6) تمثل العينات المفحوصة باستخدام البادئ**OPF - 16**

m

المؤشر

العلاقة بين العينات المأخوذة من الإنسان والمضائف الأخرى باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي المتعدد الإشكال RAPD

أظهرت تقنية التفاعل التضاعفي العشوائي المتعدد الأشكال بأستخدام البادئات الست **OPE – 07, OPF – 13 , OPF – 19 , OPC – 10 , OPF- 16 , OPA – 01,**). وجود بصمة وراثية مشتركة بين عينات الحامض النووي DNA المأخوذة من الإنسان والعينات المأخوذة من الأبقار باستخدام البادئ (OPE – 07) عند الحزمة ذات الوزن الجزيئي 500زوج قاعدي فقط في كلا العيينتين حيث تمكن هذا البادئ من تحديد البصمة الوراثية في الإنسان عند الوزن الجزيئي 500 أما البادئان (**OPF – 19**)و **OPC – 10)**) فقد تمكنا من تحديد البصمة الوراثية في عينات الحامض النووي DNA للإنسان عند الوزن الجزيئي 500 زوج قاعدي والأغنام عند الوزن الجزيئي 200 و600زوج قاعدي والأبقار عند 500زوج قاعدي بينما لم تظهر أي علاقة مع العينات المأخوذه من الجمال. اما البادئ **(OPF – 13)** والبادئ **Opc-10** فقد تمكن من تحديد البصمة الوراثية عند الوزن الجزيئي 500زوج قاعدي في عينات DNAالإنسان والأغنام عند الوزن الجزيئي300زوج قاعدي باستخدام البادئ -OPF 13ولم يتمكن البادئ OPC-10من تحديد أي بصمه وراثية في الإنسان والأبقار عند الوزن الجزيئي 700,600,200زوج قاعدي أما البادئ OPF-19فقد تمكن من تحديد البصمة الوراثية عند الوزن الجزيئي 500زوج قاعدي في الأغنام ولم يتمكن من ذلك في عينات الإنسان وفي عينات الأبقار عند الوزن الجزيئي 300و500وزج قاعدي والبادئOPF-16 فلم يتمكن من تحديد أي بصمه وراثية في الإنسان , أما بقيه البادئات فلم تتمكن من تحديد أي بصمه وراثية مشتركه بين المضائف المختلفة.ومن خلال تلك النتائج نلاحظ وجود بصمة وراثية مشتركة بين سلالة الأكياس العدرية للإنسان وسلالة الأبقار هي 500زوج قاعدي و 450 زوج قاعدي بين سلالة الأكياس العدرية للإنسان والأغنام يمكن الكشف عنها باستخدام البادئ (OPE-07) وهذا لم يحصل باستخدام بقية البادئات وهذا قد يدل على أن السلالة التي تصيب الإنسان قد تأتي من الأبقار وايضا وجود بصمة وراثيه مشتركة بين سلالة الاغنام هس 300زوج قاعدي يمكن الكشف عنها باستخدام البادئ (OPF-13)فقط. بينما لم يظهر أي تشابه وراثي بين عينات الإنسان والجمال باستخدام البادئات المختلفة وهذا يتفق مع ماذكره (22) ,بان معظم السلالات Strains التي تعود الى جنس *E.granulosus* قد تكون مخمجة للانسان باستثناء عتر الخيول والجمال التي قد تكون ذات قابلية محدودة لإصابة الانسان ويتفق ايضا مع ما ذكره (.23)ووالذي اشارالى وجود تشابه بين الشكل الذي يحدث الاصابه في الانسان والشكل الذي يحدث الاصابة في الاغنام , والذي ادى الى اعتماد سلالة الاغنام فقط في اصابة الانسان وكونة المسؤول عن اغلب اصابات الانسان بالاكياس العدرية (24)(,23) ولكن لا يمكن الجزم بذلك لأنه يحتاج الى تحديد الخارطة الوراثية لكل منها بأستخدام التتابع الجيني Gen seqenses وهذا غير ممكن بالامكانيات المتوفرة لنا حالياً.

الجدول (1)يمثل عدد الحزم وأوزانها الجزيئية للمضائف المختلفة في الدراسة باستخدام البادئات الست.

نوع المضيف	نوع البادئ	عـــــدد الحزم	الوزن الجزيئي bp
الإنسان	البادئ(OPE – 07)	4	650, 500, 450,400
	البادئ (OPF – 13)	5	750,650,500,300,250
	البادئ (OPA – 01)	–	—
	البادئ(OPF – 19)	3	550,450,350
	البادئ (OPC – 10)	4	900,700,600,500
	البادئ(OPF – 16	2	1100,750
الأغنام	البادئ(OPE – 07)	4	500,450,300,200
	البادئ (OPF – 13)	4	750,400,300,200
	البادئ (OPA – 01)	5	850,700,600,350,250
	البادئ(OPF – 19)	1	500
	البادئ (OPC – 10)	3	950,650,550
	البادئ(OPF – 16	4	750,500,400,300
الأبقار	البادئ(OPE – 07)	4	500,450,350,250
	البادئ (OPF – 13)	6	700,600,450,350,270,200
	البادئ (OPA – 01)	2	350,220
	البادئ(OPF – 19)	3	500,300,250
	البادئ (OPC – 10)	-	-
	البادئ(OPF – 16	2	300,220
الجمال	البادئ(OPE – 07)	-	-
	البادئ (OPF – 13)	-	-
	البادئ (OPA – 01)	-	-
	البادئ(OPF – 19)	1	1300
	البادئ (OPC – 10)	1	1300
	البادئ(OPF – 16	2	600,500

المصادر

1)**MathisA.,WildP.,BoettgerE.,Kapel.,M.,Depla zzes.(2005).**Mitoochondr- ial ribosome as the target for the macrolide antibioticin E.multil- ocularis. ANTIMICROB.AGENTS &CHEMOTHER.49:3251-3255.

2)**Nepalla,S ., A, Joshi ,A .Shende, S. S. Sharma (2006).** Management of echinococcosis. J.Assoc. Physicians India 54, 458-462.

3)**Heath, D.D.; Jensen , O .and L ightowlers, M. W. (2003).**Progress in control of hydatidosis using vaccination a review of formulation and delivery of the vaccine avd recommendations for piratical use in control programmes .Acta. Trop. 85(2):133-143.

4)**Wiliams, J.G.K.; Kubelik, A.R. ;LivakK.J.;Rafalski,J.A. and Tingey, S.V. .(1990) .**DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and useful as genetic markers. Nucleic acid Research .18:6531-6535.

5)**Welsh,J.andMcclelland,M.(1990).**Fingerpr inting genoms using pcr with arbitary primers. Nuclecic Acids Reserch.18:7218-7218.

6)**Innis, M.A.and Gelfand ,D.H(1990).**Optimization of PCR ,Basic methodology. Part one .In PCR protocols, Innis, M.A.;Gelfand, D.H.;Sninsky ,j.j And White, T.j.(eds) Academic Press.Inc. London

7)**Benter, T.; Papadopouls , S .; Pape , M .; Manns , M.; and poliwoda ,11.(1995).** Optimization and repeoducibility of random amplified polymorbhic DNA in human . Analytical Biochemistry. 230:92-100.

8)**Smith, E.J.;Jones, C.P.; Bartlett, J.and Nestor ,k.e;(1996).**Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the gentic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys. Poul.Sci. 75:579-584.

9)**Kong , R. ; Tzeng , D. D. and Yang , H. (2001) .** Generation of PCR bases DNA fragments for specific detection of streptomyces saraceticus. Proc. Natl. Sci. Counc. Roc (B). 25 (2):119–127 .

10)**Turcekova, L.; Snabel , V.; D'Amelio, S.; Busi, M. and Dubinsky, P. (2003).** Genetic variants of Echinococcus granulosus in slovakia recorded by random

11)**Hanfi,-R;Barhoumi,-M;Ali,-S-B; Guizani,-I.(2001).**Molecular analyses of world Leishmania RAPD markers and development of PCR Assays selective of parasites of the L.donovani specis complex .Exp- parasite .Jun ;98(2):90-9.

12)**Shock,- A;Inns,-E-A;Ymane, -I; Latham ,-S-M; Wastling –J- M. (2000).** Gentic and biological diversity among isolates of Neospora caninum.Parasitology. Jul; 123(pt):13-23.

13)**Scott,J.C.and Mcmanus ,D.P.(1994).** The random amplification of polymorphic DNA can discriminate species and strains of Echinococcus .Troical Medicine Paraitology 45,1-4.

14)**Ortona, -E;Margutti, -P; Rigano,-A.(1996).**Genetic variability in Italian sheep isolates of echinococcus granulosus .Appl-parasitol .Sep;37(3):205-8.

15)Reddy, Y-A:Rao,-J-R: Butchaiah, -G: Sharma, -B.(1998). Random amplified polymorphic DNA for the specific detection of bulaline Echinococcus.

16)Slies-Lucas , -M;Felleise, -R;Custa-Bandera, -C ;Gottstein , B; Eckert, -J.(1994). Comparative gentic analysis of Swiss and Spanish isolates of Echinococcus granulosus by southern hybridization and random amplied polymorphic DNA technique.Appl-Parasitol. Jun;35(2):107-17.

17)Smyth, J.D., (1985). *In vitro* culture of *Echinococcus Spp*. In: Proceedings of the 13th ed. Int. Conger. Hydatidol. Madrid, 84-89.

18)Wiliams, C.E. and St-Clair, D.A.(1993). Phenetic relationship and level of varipbllilty detected by restruction fragment length polymorphism and random amplified DNA analysis of cultivated and wild accessions of lycopersiscan esculentum. Genome.36:619-630.

19)الربيعي , سلوى صبر محسن إبراهيم(2005).دراسة وراثية وشكلية للرؤيسات الأولية المستأصلة من مصادر مختلفة (بشرية وحيوانية).أطروحة دكتوراه,كلية العلوم,جامعة بغداد: 116صفحة.

20)Ahmed, F.(1999). Random amplified polymorphic DNA (RAPD).analysis reveals genetic relationships among the annuale cicer species .Theor.Appl. Genet. 98:657-663.

21)Fristich, P.; Hanson,M.**A.; Spore, C.D.; Pack, P.E. and Risebewrg, L. H.(1993).** Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxon of flowering plants.plant Mol. Biol.Rep.11:10-20.

22)Thompson, C.H., (1979). Biology and Speciation of *E. granulosus*. Aust. Vet.J., 55: 93-98.

23)Stefanic S., shaikenov B.S., deplazeS P., dinkel anke,torgerson P.R., mathis A., (2004). Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* (sheep strain) in naturally infected dogs, Parasitology Research, 92, 347-351.

24)Sanchez, O. Caceres, C. Naquirel, D. Garcia, G. Patino, H. Silvia, A. C. Volotao and O. Fernandez,(2010) "Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by Equencing of the Mitochondrial Cytochrome c Oxi- dase Subunit 1 Gene," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 105, No. 6, , pp. 806-810.

*Identify genetic variation for parasite strains of *Echinococcus granulosus* in humans and some intermedete host by using the polymerase chain reaction (PCR)

Receved :10/3/2014 Accepted :26/5/2014

Noor ayed maya **Hadi mdlol hamza**

Noorr803@yahoo.com Hadihamza519@yahoo.com

Abstract

Aneighteen of human hydatidosis sample were collected (18) the period of study from November 2012 until July 2013during a surgical procedure for patients with study wasrecored5.50%, examined previous samples using the technique of the amplified (RAPD) Random amplified polymorphic DNA to determine the genetic variation between strins using random primers are 6 (OPE - 07 OPF - 13 and OPF - 19andOPC-10 and OPF _16 and OPA –01) detecting genetic variation between samples through the presence or absence of serial packages DNA in the samples studied have shown the following prefixes -The ability of the primer (OPE - 07) to determine the DNA samples for the DNA of the hydatid dieases Aladrah excised from human liver when molecular weight 400bp and 650bp as an indicator of genetically excised samples of human liver did not appear in other samples Alamadaúv. -The ability of the primer (OPF - 13) to determine the DNA nucleic acid DNA in bags Aladrah to human liver when molecular weight 300bp and 500bp appeared in samples where the man did not appear in other samples Alamadaúv-The ability of the primer (OPC - 10) to determine the DNA nucleic acid DNA of bags Aladrah to human liver when molecular weight 500bp, 600bp, 700bp, 900bp, where the samples did not appear to Amadaúv other

-Non ability of primer (OPF - 19, OPA - 01, OPF - 16) to determine any genetic fingerprint template is similar to DNA in human samples

-Ability the primer (OPE - 07) to determine the DNA nucleic acid DNA in sheep when the molecular weight 200bp, 300bp, 500bp In Alabakarand molecular Hydatid dieases , fingerprints, Random amplifie weight 500bp was unable to identify any imprint hereditary in beauty and this is this signatures are fingerprints especially this Alamadaúv only possible which set them apart from the other samples studied.

-Ability primer (OPF - 13) to determine the DNA nucleic acid DNA and excised from the livers of sheep when the molecular weight 300bp, 200bp, 400bp, 750bp and in cows 200bp,, 600bp, 700bp and was unable to identify any imprint hereditary in the DNA samples of the bags Aladrah excised of beauty.

-Ability primer (OPF - 19) to determine the DNA nucleic acid DNA of bags Aladrah excised from the liver of sheep at 500bp at the molecular weight 300bp and 500bp and beauty at 1300bp.

-Ability the primer (OPC - 10) to determine the DNA in the beauty at 1300bp and was unable to identify any genetic imprint in cattle and sheep.

-Ability the primer (OPF_ 16) to determine the DNA nucleic acid of the bags Aladrah in sheep when the molecular weight 300bp, 400bp, 500bp and 300bp when cows and camels at 500bp 600bp.

Finally, the study showed that the strains that affect humans have come from sheep and cows exclusively to the presence of fingerprints and genetic are shared between them can be detected using the initiators of OPE - 07 at the molecular weight 500bp and OPF - 13 at the molecular weight 300bp only, but this needs to be a larger study using the relay genetic Gen seqenses and all other pets near human.

Key word : hydatidosis , detecting genetic variation DNA

*The research is apart of on msc thesis in the case of the second research.