التشخيص الجزيئي لطفيلي الاميبا الحالة للنسيج في منطقة الفرات الاوسط

صبا فاضل علي
جامعة الفرات الأوسط التقنية
المعهد التقني– بابل

علي حسين مكي
كلية طب الأسنان– جامعة كربلاء

Subafadhl55@yahoo.com

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة إلى ايجاد مدى انتشار طفيلي الاميبا الحالة للنسيج في منطقة الفرات الاوسط باستخدام إحدى الطرائق الجزيئية. اجريت الدراسة على 1350 عينة غائط طرية جمعت من المرضى الذين يعانون من الإسهال في ثلاث محافظات من محافظات منطقة الدراسة (كربلاء و بابل و النجف) و بواقع 450 عينة لكل محافظة. تراوحت أعمار المرضى بين سنة واحدة إلى أكثر من 60 سنة ومن كلا الجنسين و مختلف المناطق الوافدين على بعض المستشفيات و المستوصفات والمختبرات الخاصة في هذه المحافظات في المدة من الأول من أيار 2013 وحتى نهاية نيسان 2014. جميع عينات الغائط الطرية فحصت مجهريا بطريقة المسحة الرطبة للكشف عن الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*. حفظ حوالي نصف غرام من العينات ذات التشخيص الموجب و بعض العينات السالبة بدرجة حرارة (– 20) م لحين استخدامها في الدراسة الجزيئية. انتخب ثلث العينات الموجبة المشخصة بالفحص ألمجهري (بحيث تكون هذه العينات ممثلة لمجتمع العينات الموجبة التشخيص) مع خمسة عينات سالبة لكل محافظة كمجموعة سيطرة لغرض استخلاص المادة الوراثية (DNA). صمم زوج من البادئات النوعية لتشخيص طفيلي الاميبا الحالة للنسيج باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. اعتمد التشخيص الجزيئي على نتائج تضخيم البادئات النوعية Specific primers بتقنية PCR لمنطقة للحيز ألاستنساخي الداخلي (ITS1) الخاصة بتشخيص طفيلي الاميبا *E. histolytica* عند ناتج بلغ (355) bp. حضر مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل باستعمال عدة Accupower® PCR Premix المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية و تمت عملية التضخيم باستخدام جهاز المبلمر الحراري . أجريت عملية الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز 1.5% و صبغه بروميد الاثيديوم و صور الجل بجهاز مصور الحزم الجينية تحت الأشعة فوق البنفسجية. بالاعتماد على نتائج هذه الدراسة فان الفحص ألمجهري أظهر إن إجمالي نسب الإصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج كانت (15.1 و 13.3 و 16.7) % في كربلاء و بابل و النجف على التوالي. و لكون نسب الخمج متقاربة في المحافظات الثلاثة و عدم وجود فروق شاسعة بين هذه النسب تم معاملة المحافظات الثلاث كمنطقة واحدة هي (الفرات الاوسط). فيما يخص التشخيص الجزيئي بتقنية PCR تبين إن نسبة الخمج الحقيقية بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج في منطقة الفرات الأوسط هي 12.8 %.

الكلمات الدالة: طفيلي الامبيا, حيز الاستنساخي الداخلي، التشخيص الجزيئي , تقنية PCR.

Abstract

This study aimed to find the prevalence of *E. histolytica* parasite in Middle Euphrates region – Iraq, using one of the molecular methods. The study was conducted on the (1350) stool samples from diarrhea - suffering patients in three provinces of Middle Euphrates region: Karbala, Babel and Al-Najaf (450 in each province). Patients ranged in age (1 to more than 60) years and from both sexes and different regions who were attended to some hospitals, dispensaries and private laboratories in these governorates during the period from the first of May 2013 till the end of April 2014. All collected fresh samples were examined microscopically by wet-mounts method for *E. histolytica* detection. Around 0.5 g of each positive and some of negative stool samples in microscopic examination was preserved at -20Cº until use in molecular study. One third of positive samples in microscopic examination (which was selected to be representative for all positive samples) from each province and five of negative one as control group were submitted to the nucleic acid (DNA) extraction. One pairs of specific primers was designed to be used for molecular diagnosis of *E. histolytica* using PCR technique. Primers materials were supplied by Bioneer Co. and prepared according to its instructions. Molecular diagnosis of *E. histolytica* were performed using PCR reaction with amplification of the 355-bp fragments from the internal transcribed spacer region1 ITS1**.** The PCR was conducted using Accupower® PCR Premix kit/ Bioneer as DNA polymerase and the reaction was performed in a thermocycler. The products were submitted to 1.5 % agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and the gel images were

recorded under transilluminator UV light. Based on the results of this study, microscopic examination showed that the total percentages of infection with *E. histolytica* were (15.1, 13.3 and 16.7) % in Karbala, Babel and Al- Najaf respectively. As infection rates are close in the three provinces and the absence of vast differences between these percentages, so the three provinces were treated as one (Middle Euphrates region). For the molecular diagnosis by using PCR technique the true prevalence of *E. histolytica* in Middle Euphrates region was found to be %12.8.
Keywords: *E. Histolytica*, ITS1, molecular methods, PCR.

1- المقدمة

لا يزال الفحص ألمجهري يمثل الطريقة الرئيسة المستعملة لتشخيص الطفيليات المعوية في العراق. ان دقة هذه الطريقة تعتمد بشكل كبير على مهارة الفاحص وأحيانا تكون غير دقيقة حيث لا يمكن التمييز بواسطتها بين الاميبا المرضية *E. histolytica* وغير المرضية مثل *E. dispar*. تم مؤخرا إدخال تقنيات أكثر حساسية و خصوصية للتعرف على هذه الطفيليات منها الطرق الجزيئية. ان استخدام الطرائق الجزيئية جاء للحد من بعض أوجه القصور المرتبطة بالطرق التقليدية في الكشف عن الاوالي المرضية. هناك عدد من الفحوصات الجزيئية تستخدم التضخيم الجيني مع بوادئ نوعية مثل تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي Polymerase Chain Reaction (PCR) و التي طورت لهذا الغرض. لقد ازدادت تطبيقات الأساليب الجزيئية حول العالم و بذلت الكثير من الجهود لتحسين فهم وبائيات الاوالي المعوية باستخدام الأساليب الجزيئية. ان استعمال هذه التطبيقات محليا كان بشكل محدود للغاية مع وجود عدد قليل من الدراسات في هذا الاتجاه وعليه هنالك حاجة كبيرة لتطوير مثل هذه الدراسات في العراق.

يعد تشخيص الطفيليات عبر مناطق Internal Transcribed Spacer Region 1 (ITS1) حديث نسبيا و إن امتلاك منطقة ITS1 ثبات نوعي تجاه تأثيرات العوامل البيئية في النوع الواحد وتغايرها بين الأنواع فضلا عن سهولة الكشف عنها وسرعة تضخيمها منح هذه المنطقة أهمية كبيرة جداً في عمليات التشخيص الجزيئي باستخدام تقنية PCR (Molina *et al.* , 2007). تمتاز تقنية PCR بكونها ذات دقة عالية في الكشف عن الأعداد المنخفضة للطفيليات في عينات الغائط مقارنة بالطرق التقليدية كطريقة الفحص ألمجهري (Breathnach *et al.*, 2010). إن الغرض الرئيس من هذا العمل هو إجراء دراسة حول مدى انتشار طفيلي الاميبا الحالة للنسيج في مرضى منطقة الفرات الأوسط من خلال دراسة الموضوع في ثلاث محافظات (كربلاء و بابل و النجف) باستعمال احد الطرائق الجزيئية.

2- استعراض المراجع

تعد العدوى بالطفيليات المعوية من المشكلات الطبية المهمة في معظم الدول النامية (Sayyari *et al.*, 2005). و تنتشر عادة في المناطق التي تفتقر إلى الصرف الصحي والمياه النظيفة (Clark *et al.*, 2000). إن داء الاميبات Amoebiasis يأتي بالدرجة الثالثة بعد الملاريا Malaria و البلهارزيا Belharisiasis في نسب الوفيات بالطفيليات سنويا (Ravdin & Stauffer,2005). فقد سجل داء الاميبات سنويا 40,000 – 100,000 حالة من حالات الوفيات الناتجة عن الأمراض الطفيلية في العالم (Stanley, 2003). يغزو الطفيلي الطبقة المخاطية وتحت المخاطية للأمعاء مسببا التهابا أو قرحا أو ارتشاحا

لهذه الطبقة (1995) , Mendis، ونتيجة لاستجابة العائل و تحسسه لوجود الطفيلي يحدث الإسهال وغالبا ما يكون مصحوبا بمواد مخاطية ودموية ، إذ تحدث الإصابة عند ابتلاع الأكياس عن طريق الطعام والشراب الملوثين لتستقر في القولون وتتغذى على الدقائق الغذائية و البكتريا، وتهاجم جدار المعي لتكون القرح وتسبب الزحار وقد تتنقل بواسطة الدم إلى مواقع خارج الأمعاء مثل الكبد والرئة والدماغ (Stanley,2003).

لقد اجريت العديد من الدراسات وباستعمال شتى الطرائق لمعرفة نسب انتشار هذا لمرض في العالم و العراق. تم فحص 300 حالة من حالات الإسهال الشديدة للأطفال دون السنة من العمر في البرازيل في مدينة Recife و كانت النسبة الإجمالية للخمج بالاميبا الحالة للنسيج هي 52% (Lins &Silva,2000). أوضحت دراسة (2001) Al-Dulaimi إن نسبة الخمج بالاميبا الحالة للنسيج كانت 35.66% مع وجود اختلاف في نسب االخمج بين الأجناس ، قام (2001) Yury *et al.* باستخدام إحدى الطرق الجزيئية في تشخيص الاميبا المرضية وغير المرضية وكانت نسبة الخمج بالاميبا غير المرضية *E. dispar* هي 75.5% مقابل 24.5% للاميبا المرضية *E. histolytica*. اجرى (2008) الكبيسي دراسة مسحية للطفيليات المعوية في منطقتي عوفي و الطهمازية في محافظة بابل إذ فحصت 1224 عينة غائط وقد وجد أن نسبة الخمج بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج كانت 18.1%. قام AL-yaquob (2008) في محافظة البصرة باستخدام تقنية تفاعل PCR للتمييز بين *E. hstolytica* و*E. dispar* . أجرت (2011) AL-Qumashi دراسة جزيئيه مناعية لطفيلي الاميبا وسجلت نسبة الخمج بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج 18.6%. كشفت دراسة (2012) Hamad & Ramzy ان نسبة الخمج بالاميبا الحالة للنسيج كان 30% في اربيل. بينت دراسة جزيئية لعلاقة عاملي الضراوة CP1 و CP5 و بعض التغيرات الدمية و الكيموحيوية المناعية للأشخاص المخمجين بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج في محافظة النجف ان نسبة الخمج بالطفيلي كانت (23.9%) حسب الفحص المجهري وعند استعمال 162عينة كانت موجبة بهذا الفحص تبين ان 25% منها كانت حاوية على عاملي الضراوة CP1 و CP5 (AL- Torfi,2014).

3- المواد و طرائق العمل

خلال المدة من الأول من أيار 2013 وحتى نهاية نيسان 2014 جمعت 1350 عينة غائط طرية من المرضى الذين يعانون من الإسهال في ثلاث محافظات هي كربلاء و بابل و النجف (بواقع 450 لكل محافظة . تراوحت أعمار المرضى بين سنة واحدة إلى أكثر من 60 سنة ومن كلا الجنسين ومختلف المناطق الوافدين الى بعض المستشفيات و المستوصفات و المختبرات الخاصة في هذه المحافظات. فحصت جميع عينات الغائط مجهريا بطريقة المسحة الرطبة (باستخدام المحلول الفسلجي و محلول اليود اللوكالي ومحلول صبغة المثيل الزرقاء) للكشف عن الاميبا الحالة للنسيج 10X , 40X (Singh *et al.*, 2009). حفظ حوالي نصف غرام من العينات ذات التشخيص الموجب وبعض العينات السالبة بدرجة حرارة (-20)م لحين استخدامها في الدراسة الجزيئية.

انتخب ثلث العينات الموجبة التشخيص بالفحص ألمجهري (بحيث تكون هذه العينات ممثلة لمجتمع العينات الموجبة التشخيص) و ذلك لتقليص عدد العينات المفحوصة بالطريقة الجزيئية مع خمسة عينات سالبة لكل محافظة كمجموعة سيطرة لغرض استخلاص المادة الوراثية (DNA). استخلص الحمض النووي من عينـات الغائط البالغ عددها 68 عينة ذات تشخيص موجب إلى جانب 15 عينة سالبة باستخدام عدة AccuPrep® Stool DNA Extraction kit و حسب تعليمات الشركة المصنعة. تم فحص الحمض النووي DNA المستخلص من عينات الغائط باستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO – USA) الخاص بالكشف عن تراكيز الأحماض النووية (DNA and RNA) و قياس نقاوتها(Promega , 2009). صمم البادئ الخاصة بتشخيص طفيلي الاميبا الحالة للنسيج عبر منطقة (ITS1) بالاستعانة بموقع بنك الجينات NCBI للحصول على تسلسل القواعد النايتروجينية للمنطقة المستهدفة و استعمل برنامج Primer 3 plus (Bioinformatics, 2012) لتصميم البادئ النوعي الامامي و الخلفي

ITS1 EH [5- AACTGCGGACGGCTCATTAT -3] ألأمامي Forward (F)

ITS1EH [5- GGTAATTTACGCGCCTGCTG -3] العكسي Reverse (R)

اختبرت البادئات المصممة وفق الشروط المقترحة من قبل (New England Biolabs, 2013) و اتضح بأنها تحقق جميع هذه الشروط. جهزت البادئات التي استخدم في هذه الدراسة من قبل شركة Bioneer الكورية بشكل مسحوق مجفف بالتجميد (lyophilized) و تم استعماله حسب تعليمات الشركة المنتجة.

حضرت المحاليل الازمة وفق الطرق المؤشرة ازاء كلا منها حيث حضر محلول اليود اللوكالي 1% (1997, Zeibig) ومحلول صبغة المثيل الزرقاء BMB (Elizabeth , 1997). حضر محلول التحميل و المحلول المنظم (TBE-1X) (Sambrook *et al.,* 1989) اما المحلول المنظم (0.5 M – EDTA) فحضر حسب طريقة (Kern & Brody, 2000) كما حضر محلول صبغة بروميد الاثيديوم (0.5%) حسب طريقة (Maniatis *et al.*, 1982).

حضر مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل باستعمال عدة Accupower® PCR Premix المجهزه من قبل شركة Bioneer الكورية وحسب تعليماتها بحجم 20 مايكروليتر (حيث تم اضافة 5 مايكروليتر من المادة الوراثية و 1.5 مايكروليتر من كلا من البادئ الامامي و الخلفي (بتركيز 10 pmol) الى مكونات كل انبوبة من انابيب PCR و اكمل الجم الى 20 مايكروليتر باستخدام الماء الخالي من الايونات). نفذت إجراءات التضخم بتقنية PCR وفق بروتوكولات محددة بعد ايجاد الحل الامثل لعناصر التفاعل و التي تضمنت تركيز المحاليل reagent concentrations و الدورات الحرارة cyclingTemperatures وعدد الدورات Cycle number وفق تعليمات الشركة المنتجة للبوادئ ومواد البلمرة المستخدمة و في ضوء دلائل التقنيات المنشورة في هذا المجال (Roche , 2006 ; Bartlett and Stirling, 2003). نقلت الأنابيب بمكوناتها لجهاز المبلمر الحراري PCR Thermo cycler نوع (Techne TC-3000.USA). اتبع البرنامج الموضح في جدول رقم (1) الذي يمثل حالات الدورات الحرارية لتضخيم DNA بتقنية PCR بحسب تعليمات الشركة

المنتجة. ان درجة حرارة الاستطالة Annealing (Ta) و الوقت اللازم للاستطالة Extension المثلى تم ايجاده حسب برنامج Optimase Protocol Writer (NVMD , 2013). أجريت عملية الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز 1.5% و ذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product analysis و حسب ما جاء في (Bartlett and Stirling, 2003). حيث تم بعد اكتمال عملية التحميل أغلق غطاء جهاز الترحيل و تم تشغيله باستخدام تيار كهربائي بشدة 80 امبير وفرق جهد 100 فولت و لمدة ساعة واحده. بعد الانتهاء من عملية الترحيل تم التقصي عن نتائج الترحيل و ذلك بتعريض الهلام إلى الأشعة فوق البنفسجية و باستعمال جهاز UV transilluminator لملاحظة وجود حزمة ألجين وتحديد النتائج الموجبة ثم المطابقة مع الدليل الحجمي DNA Ladder (1500- 100).

الجدول (1): البرنامج المستخدم في جهاز الدورات الحرارية Thermo cycler

عدد الدورات	Time مدة	Temperature	PCR Steps خطوات
1	3 min	95	Initial denaturation بدء
30	30 sec	95	Denaturation المسخ
	30 sec	58	Annealing الالتحام
	40 sec	72	Extension الاستطالة
1	5 min	72	Final Extension

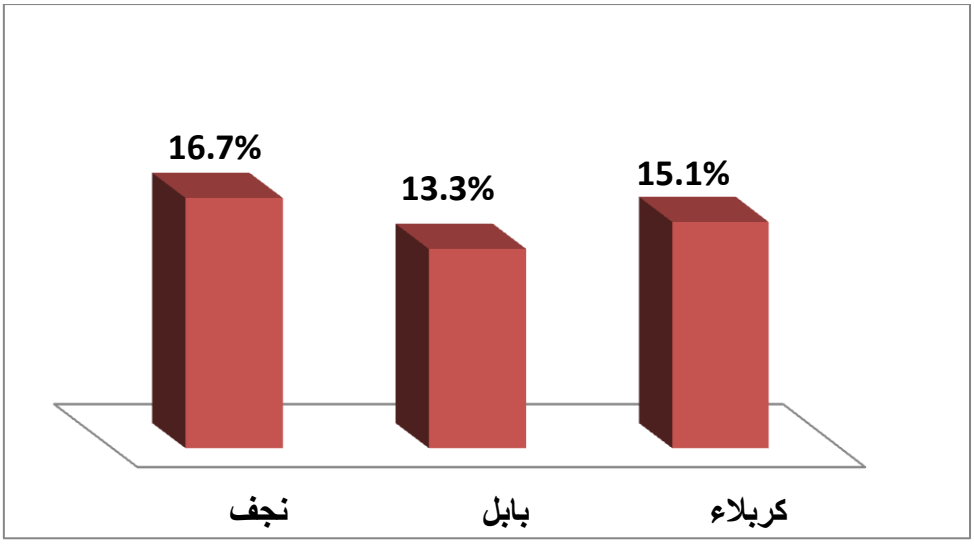
3- النتائج و المناقشة

1.3- نتائج الفحص المجهري

بينت نتائج الفحص ألمجهري ل 450 عينة غائط للمرضى من كل محافظه من المحافظات قيد الدراسة في كربلاء و بابل و النجف إن أعداد العينات ألموجبه بالفحص ألمجهري لطفيلي الاميبا الحالة للنسيج هي 68 و 60 و 75 و بنسب خمج بلغت (15.1 و13.3 و16.7)% للمحافظات المذكورة على التوالي كما مبين في الجدول رقم (2) و الشكل رقم (1) .

جدول (1): اعداد و نسب العينات الموجبة التشخيص في المحافظات الثلاث حسب الفحص ألمجهري

العينة	المحافظة		
	كربلاء	بابل	النجف
عدد العينات المفحوصة	450	450	450
عدد العينات الموجبة التشخيص	68	60	75
النسبة المئوية للعينات الموجبة %	15.1	13.3	16.7



شكل (1): نسب الخمج بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج في المحافظات الثلاث حسب الفحص ألمجهري

اتضح من نتائج هذه الدراسة ان نسب الخمج متقاربة في المحافظات الثلاثة وعدم وجود فروق شاسعة بين هذه النسب. فنسب الخمج بطفيلي الاميبا الحالة للنسج كانت ما بين 13.3% و16.7 %. قد يعود السبب في ذلك إلى تشابه الظروف البيئية و تقارب المستوى الاقتصادي والاجتماعي والثقافي والوعي الصحي لسكان المحافظات الثلاثة. لذلك فان مجموع النتائج للمحافظات الثلاث يمكن اعتبارها ممثلة لمنطقة الدراسة و عليه فان نسبة الخمج الكلية لمنطقة الفرات الأوسط تكون 15%.

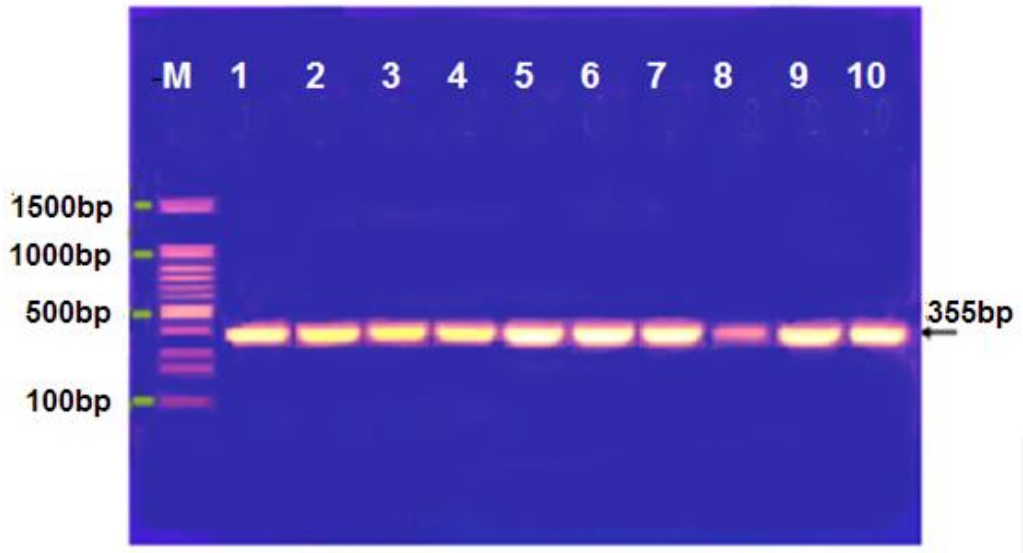
يلاحظ هنا بأنه على الرغم من التطور الكبير في الوسائل التشخيصية والعلاجية و الوقائية فقد اظهرت نتائج هذه الدراسة ان نسب الخمج لازلت مرتفعة نسبيا في المحافظات الثلاث المعنية بهذه الدراسة اذا ما قورنت بالبلدان المجاورة مثلا فقد أظهرت دراسة للتحري عن الطفيليات المعوية لمراجعي المراكز الصحية في الكويت بان نسبة الخمج 5.9% بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج (Al-Nakkas *et al.*, 2006). و بين (2005) Sayyari *et al.* إن معدل الخمج بمختلف الطفيليات المعوية في مجموعة من المراكز الصحية في جمهورية إيران الإسلامية بلغت 19.3%. قد يعزى سبب ذلك إلى توفر الظروف التي تساعد على انتشار هذه الطفيليات محليا مثل البيئة غير النظيفة والعادات غير صحية للإنسان ومستوى السكان الاقتصادي و الاجتماعي فضلا عن قلة مراعاة قواعد الصحة العامة. لقد ذكر Cox (1998) إن من بين العوامل التي تساعد على انتشار الخمج بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج هو ارتفاع مستوى الملوثات في البيئة وانتشار الذباب بسبب كثرة النفايات فضلا عن مقاومة الطفيلي للمطهرات الكيميائية بما في ذلك الكلور و البقاء حيا لعدة أسابيع في البيئات الرطبة.

قد تعزى أسباب الإسهال في بقية المرضى إلى مسببات طفيلية أخرى او فيروسية أو بكتيرية أو سوء هضم او نتيجة لأمراض أخرى (الحمود وجماعته، 2002 و Jarallah,2012). لوحظ بان نتائج الدراسة الحالية اتفقت و اختلفت مع نتائج الدراسات السابقة ، قد يعزى سبب الاتفاق و الاختلاف الى عدة أسباب منها مدى تشابه و اختلاف الظروف البيئية و المناخية و حجم ونوعية مجتمع العينات المدروسة إضافة إلى تاريخ ومدة

إجراء الدراستين. حيث اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع بعض الدراسات السابقة مثل دراسة هويدي (2000) والتي توصلت إلى نسبة 14.2 % في الشطرة و كانت النسبة 13% لدى Al-Dulaimi (2001) و نسبة 12.4% سجلت من قبل Al-Marzoqi, (2004) و قام الكبيسي (2007) بتسجيل نسبة 12.8% في كربلاء اما دراسة كاظم (2007) في بابل فقد بلغت النسبة فيها 17.37% و في بغداد وجد الشعيبي (2000) **إن** نسبة الخمج بهذا الطفيلي بلغت 17.7%. فضلا عن ذلك سجل كل من الموسوي (2004) نسبة اصابة 19.9% في كربلاء و ظهر في النجف لدى (2007) الكبيسي و اخرون نسبة الخمج 23.8% بالطفيلي و وجدت ألسلامي (2005) نسبة بلغت 24.57%.

1.3- نتائج الفحص بالتقنية الجزيئية:

بينت نتائج قياس تراكيز و نقاوة الحمض النووي المستخلص بان قيم التراكيز تتراوح بين (20 - 50) µg/ml ونقاوتها تراوحت بين 1.8 إلى 2. اظهرت نتائج تضخيم البادئ النوعي Specific primer لمنطقة (ITS1) الخاصة بتشخيص طفيلي *E. histolytica* نسبة الخمج المؤكدة بعد إجراء التفاعلات اللازمة لعملية الفحص بتقنية PCR. حيث تظهر العينات الموجبه بشكل حزم مضيئة عند ناتج معين. الصورة رقم (1) تبين حزم منطقة ITSI بعد عملية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لناتج فحص PCR لمنطقة ITS1 الخاصة بتشخيص الطفيلي. في هذه الصورة الأرقام من 1-10 تمثل أرقام بعض العينات الموجبة لهذا الفحص و التي تظهر بشكل حزم متالقة بناتج قدره 355 bp.



صورة (1) : حزم منطقة (ITS1) الخاصة بتشخيص طفيلي الاميبا الحالة للنسيج على هلام الاكاروز بعد عملية الترحيل الكهربائي

M : سلم قياسي Marker ladder

1- 10 تمثل ارقام العينات الموجبة في الفحص بناتج قدره 355 bp.

بعد اجراء عملية التشخيص الجزيئي بتقنية PCR تبين انه من بين العينات ايجابية التشخيص بطفيلي الاميبا الحالة للنسج بموجب الفحص المجهري والبالغ عددها 68 و بعد تضخيم البادئات النوعية لمنطقة ITS1 ان 58 عينة (85.3%) كانت ايجابية التشخيص بهذا الفحص و جمع العينات السالبة التشخيص بالفحص المجهري (مجموعة السيطرة) كانت سالبة ايضا. من النتائج المبينة تكون نسبة الخمج الكلية بطفيلي *E. histolytica* المشخصة بالكشف عن منطقةITS1 بموجب فحص PCR لمنطقة الدراسة هي 12.8 %. قد يعود سبب تشخيص باقي العينات البالغ نسبتها (14.7%) في هذا الفحص على انها سالبة لوجود انواع أخرى من الاميبا. حيث إن التميز بين أنواع الطفيليات ضمن الجنس الواحد لا يمكن إن يحدد بشكل مطلق الا عبر استخدام التقنيات الجزيئية لاسيما مناطق ITS1 Machorro,*et al*. 2010 (Torres –). جاءت نتيجة الكشف متوافقة مع ما بينته دراسات اخرى حول طفيلي الاميبا حيث شخصت (207) حالة خمج بالفحص ألمجهري أما فحص PCR فأعطي (161) حالة فقط وهذه الدراسة اكدت على أهمية التفريق بين نوعي الاميبا *E. histolytica* و *E. dispar* و اللذان لا يمكن التميز بينهما بالفحص المجهري (Lebbad & Svard, 2005)، و متوافق ايضا مع ما توصل اليه الباحث (2007) Fotedar *et al*. في استراليا و ما جاء به الباحث في اسبانيا (2010) Gutierrez-Cisneros *et al*. حيث أكدوا على أهمية التمييز بين (*E. histolytica* و *E. dispar*) المتشابهة مظهريا عبر المجهر و المختلفة جينيا. لقد استنتجت دراسة (2011) AL-Oumashi إن الفحص ألجزيئي هو ألطريقه الوحيدةُ التي تفرق بين اميبا الزحار المرضية و اميبا الدسبار غير المرضية و باستعمال فحص PCR. على كل حال يجب التأكيد هنا على ان استخدام التقنيات الجزيئية في التشخيص تكون اكثر دقة و لها مزايا أفضل بكثير من الطرق التقليدية لكونها تعتمد على تسلسل الجينوم لنوع الطفيلي (Verweij *et al*., 2003) و بين الباحث نفسه ان العديد من الاختبارات بخصوص انتشار طفيلي الاميبا باستخدام التشخيص الجزيئي ادى إلى إعادة تقييم وبائيات داء الأميبات من حيث الامراضية morbidity لاسيما في المناطق الجغرافية ذات الاستيطان endemic العالي للمرض.

استعمل (2004) Nesbitt, *et al*. تقنية PCR للتعرف على انتشار كل من طفيلي *E. histolytica* و*E dispar* . و استخدم (2005) Ramos, *et al*. التقنية نفسها للتمييز بين هذين النوعين من الاميبا (*E. histolytica* and *E. dispar*) في المكسيك. إن التعرف على الأنماط الوراثية للطفيليات الممرضة بواسطة الطرق الجزيئية ذات الحساسية العالية له أهمية كبيرة في منع العلاج غير الضروري بالأدوية و يزودنا بمعلومات عن وبائية و انتشار ألطفيلي (Franzen *et al*., 2009).

اجرى الباحث (2012) Baig *et al*. في الهند دراسة مقارنة بين الطرق التشخيصية الروتينية والطرق الجزيئية واستنتج إن استخدام الطرق الروتينية مثل الفحص ألمجهري تؤدي احيانا إلى التشخيص الخاطئ مقارنة بالتقنيات الجزيئية مثل PCR. وأخيرا لا بد من الإشارة هنا الى نجاح البادئات المصممة في تشخيص الطفيلي

وذلك بتضخيم الجزء المستهدف من منطقةITS1 و ان ظهور نواتج الترحيل عند القيم المستهدفة بالتصميم والبالغة (355) pb كما موضح في الصورة (1) يدلل على ذلك و يؤكد دقة التشخيص. و تجدر الاشارة هنا الى منطقة ITS1 وهي واحدة من أهم مناطق جينوم الطفيليات التي يعتمد عليها التشخيص الجزيئي سواء على مستوى الأجناس ام على مستوى الأنواع (Paul *et al.* , 2009). إن الجمع بين المجهر والأساليب الجزيئية مكن المختصون من التفريق بين أنواع الامبيا غير المسببة و المسببة للأمراض وبالتالي تقليل عدد المرضى الذين قد يعالجوا دون داع (Acquah, 2010).

المصادر

الحمود، محمد حسن و يوسف و ليد حميد و حميد نايف البطاينة (2002). علم بيولوجيا الإنسان: الهضم، الدوران، التنفس و النقل العصبي. الأهلية للنشر و التوزيع، عمان: 300 صفحة.

الخفاجي، علي حسن عبود و محيسن فرحان ضمد و إسماعيل كاظم عجام (2002). انتشار الطفيليات المعوية لدى تلامذة بعض المدارس الابتدائية في قضاء الهاشمية، محافظة بابل. مجلة جامعة بابل/ العلوم الصرفة والتطبيقية. مجلد (7) عدد (3): 519- 528.

ألزرفي، خوله عبد الله سليمان عبد الله (2005). دراسة وبائية لبعض الجوانب المرضية للطفيليات المعوية المشخصة بين المرضى الوافدين والراقدين في مستشفيات محافظة النجف الاشرف. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات. جامعة الكوفة : 56 صفحة.

ألسلامي، شيماء شاكر حميد (2005). دراسة انتشار الطفيليات المعوية المشتركة في الإنسان والحيوانات الحقلية في محافظة الديوانية. رسالة ماجستير. كلية الطب البيطري. جامعة بغداد : 90 صفحة

الشدود ،هدى علي صالح (2002). دراسة وبائية المسببات الطفيلية لالتهاب الزائدة الدودية في محافظة النجف. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الكوفة : 67 صفحة.

الشعيبي، مهند محمد مخلف(2000). دراسة مقارنة للإصابة بالطفيليات المعوية بين طلاب المدارس الابتدائية في بغداد. رسالة ماجستير، كلية العلوم , الجامعة المستنصرية : 77 صفحة.

الموسوي ، كوثر عبد الحسين (2001). انتشار الاصابات الطفيلية المعوية في مدينة كربلاء. رسالة ماجستير،كلية التربية (ابن الهيثم) ،جامعة بغداد : 105 صفحة.

الموسوي، ملاك ماجد (2004). الطفيليات المعوية عند المصابين بالإسهال في محافظة كربلاء. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بابل: 56 صفحة.

الكبيسي، علي حسين مكي (2007).تأثير المستخلصات المائية لبعض النباتات في تثبيط المسببات البكتيرية والطفيلية للإسهال في محافظة كربلاء. اطرحة دكتورا.كلية التربية (إبن الهيثم) ،جامعة بغداد : 152 صفحة.

الكبيسي، علي حسين و قيصر عبد السجاد و محمد رمضان و يعرب مضر(2007) مسح الطفيليات المعوية في الحيدرية– النجف. مجلة جامعة بابل العلوم الصرفة والتطبيقية. مجلد (19) عدد (3): 37 – 50.

الكبيسي، علي حسين مكي (2008). دور التلوث في انتشار الطفيليات المعوية بين سكان ناحية الكفل في محافظة بابل/ العراق. مجلة جامعة كربلاء. مجلد (5) عدد (2): 180-187.

كاظم، سماح احمد (2007) دور التلوث في انتشار الطفيليات المعوية بين سكان ناحية الكفل محافظة بابل.مجلة جامعة كربلاء العلمية.المجلد (5) عدد (1) :37 – 54.

هويدي، جواد رشيد (2000). انتشار الطفيليات المعوية بين سكان مدينة الشطرة. مجلة التقني/البحوث التقنية. مجلد(13)عدد (63) : 9– 15.

Acquah, Samuel K. E. (2010). Significance of intestinal protozoan parasites as diarrhea-causing infectious agents in children presenting to the agogo presbyterian hospital, M. Sc. Thesis, college of health sciences, PP: 85.

Al-Dulaimi, K. K.(2001).Epidemiological study of *Entamoeb histolytica* in Al-Romadi governorate. M.Sc. Thesis, University of Al- Anbar. PP: 67.

Al-Oumashi, G. B. (2011). Evaluation of some molecular and immunological tests for diagnosis of *Entamoeba histolytica* in alidwania area, Ph. D. Thesis, college of veterinary medicine, Al-Qadisiya university, PP : 91.

Al-Torfi, Z. A. (2014). A study the virulence factors (ehcp1&ehcp5) and some immunobiochemical and hematological changes in humans infected with *Entamoeba histolytica* in al-najaf, Ph. D.Thesis, faculty of science, university of kufa, PP: 140.

Al-Marzoqi, A. H. M. (2004). Incidence of rotavirus and other enteropathogens causing acute diarrhea in Hilla infants. M. Sc. Thesis, Coll. Med., Univ. Babylon pp:114.

Al-Nakkas, E. M.; Al-Mutar, M. S.; Shweiki, H. M.; Sharma, P. N. and Rihan, S. (2006). Parasitic infections in Kuwait: A study based on primary care centers , middle east journal of family medicine, 3(3): 1-2.

Baig, M. F.; Khara, S. A. and Badvi, J. A. (2012). A comparative study of different methods used in the detection of *Giardia lamblia* on fecal specimens of children, annals of tropical medicine and public health, India ,5 (3):163-167.

Bartlett, J. M. S. and Stirling , D. (Editors) (2003). PCR Protocols, 2ed ed. Humana Press Totowa, New Jersey, PP: 531.

Breathnach, A. S.; McHugh, T. D. and Butcher, P. D. (2010). Prevalence and clinical correlations of genetic subtypes of *Giardia lamblia* in an urban setting. Epidemiol. Infect., 138:1459–1467.

Bioinformatics (2012). Primer 3 plus, (V.0 .4. 0) , Version 4. Bioinformatics Org. http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi

Brody, J. R. and Kern, S. E. (2004). History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. Anal Biochem,333(1):1-13.

Clark, C. G.; Espinosa-Cantellano M. and Bhattacharya, A. (2000). *E. histolytica*: an overview of the biology of theorganism; in Amebiasis (ed.) J. I. Ravdin. (London:Imperial College Press) 1st edition., 1(3):45.

Cox, F.E.G. (1998). Parasitic protozoa. In: Cox, F.E.G. (ed.) Modern Parasitology A text book of parasitology, 2nd ed., Blackwell Science Ltd, Oxford, London, pp: 1-9.

Fotedar, R.; Stark, D.; Beebe, N.; Marriott, D.; Ellis, J.; Harkness, J. (2007) .PCR detection *of Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. J. Clin. Microbiol, 45: 1035-1037.

Franzen, O.; Hultqvist, J.; Castro, E.; Sherwood, E. ; Ankarklev, J.; Reiner, D. ; Paln, D.; Ander, J. ; Andersson, B. S. and Svard, G. (2009). Draft Genome Sequencing of *Giardia intestinalis* Assemblage B Isolate GS: Is Human Giardiasis Caused by Two Different Species. POLS pathogens, 5(8):16-22.

Gutierrez-Cisneros,M. J.; Cogollos, R.; Lopez-Velez, R.; Martin-Rabadan, P.; Martinez-Ruiz, R.; Subirats, M.; Merino, F. J. and Fuentes, I. (2010). Application of real-time PCR for the differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in cyst-positive faecal samples from 130 immigrants living in Spain. Ann. Trop. Med. Parasitol, 104: 145-149.

Hamad, N. R. and Ramzy, I. A. (2012). Epidemiology of *Entamoeba histolytica* among children in Arbil province, Kurdistan Region Iraq. Journal of research in Biology, 1:57-62.

Jarallah, H. M. (2012). Intestinal parasitic infections among rural villages in Basrah marshes regions, Available online at: Journal of Basrah Researches Sciences, 38(2) :40 -44.

Lebbad, M. and Svard, S. G. (2005). PCR differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from patients with ameba infection initially diagnosed by microscopy. Scand. J. Infect. Dis., 37: 680–685.

Lins, M. G. M. and Silva, G. A. P. (2000). Diarrheal disease in hospitalized children: Importance of the persistent diarrhea. J. Pediatr. (Rio de Janero), 76(1): 37-43.

Maniatis, T. ; Frith, E. F. ; and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning laboratory Manual.1st ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, N.Y: 55-106.

Mendis, L. (1995). Bacteria yeast and protozoan's associated with diarrheal disease in Singapore . pathology J., 27(1): 52-84.

Molina, N.; Polverino, D.; Minvielle, M. and Basualdo, J. (2007). PCR amplification of *Giardia Lamblia* in formalin fixed feces. Rev. Latinoam. Microbiol, 49(1-2): 6-11.

New England Biolabs (2013). Guidelines for PCR Optimization with Taq DNA Polymerase "https://www.neb.com .

Nesbitt, R. A; Mosha, F. W.; Katki, H. A.; Ashraf, M.; Assenga, C. and Lee, C. M. (2004). Amebiasis and comparison of microscopy to ELISA technique in detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. J. Nat. Med. Assoc., 96: 671–677.

Paul, T. ; Simone, M. and Thompson, R. C. (2009). Variationin *Giardia* : towards a taxonomic Revision of the genus. Trand in parasitology, 25 (2) : 93- 100.

Promega (2009). Protocols & Applications Guide, promega Corporation, USA..www.promega.com/~/media/files/resources/paguide/letter/paguide_us.pdf.

Ramos, F. ; Moran, P. ; Gonzalez, F. ; Garcia, G.; Ramiro, M.; Gomez, A. ; de Leon Mdel, C.; Melendro, E. I. ; Valadez, A. and Ximenez, C. (2005). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural Mexican community. Exp. Parasitol., 110: 327–330.

Ravdin, J. I. and Stauffer, W. M. (2005). *Entamoeba histolytica* (Amoebiasis). In: Man-dell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases,. 2 Ed., Phiadelphia: Churchill Livingstone.

Roche (2006). PCR Application Manual , 3rd edition ,Roche Applied Science , GmbH, Germany PP.340. http://www.gene-quantification.de/ras-pcr-application-manual-3rd-ed.pdf

Sambrook, J. ; Fritsch, E. F. ; and Maniatis,T. (1989). Molecular loning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., PP: 93-129.

Singh, A. ; Ericttouft, B. H and Willim, A. C. (2009). Rapid diagnosis of intestinal parasitic protozoa. J. infect. Dis. 61 (3): 280-286.

Stanley, S. L. (2003). Amebiasis. Lancet, 361: 1025- 1034.

Torres-Machorro, A. L.; Herna´ndez, R. O.; Mar´ıa Cevallos, A. and Lopez-Villasen, I. m. (2010). Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms : witnesses of phylogeny? FEMS Microbiol. Rev, 34 (10): 59–86.

Verweij, J. J.; Laeijendecker, D.; Eric, A. T. and van-Lieshout, L. (2003). Detectionand Identification of *Entamoeba* Species in Stool Samples by aReverse Line Hybridization Assay. J. Clin. Micro., 14(11) :5041–5045.

Yury, O. D.; Nunez, M. A.; Fernandez, D. A.; Torres-nu´nez, J. A.; Silva, I. C; Montano, j. l.; Maestre, G. H. and Luis, F. (2001). Multiplexpoly merase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba Histolytica* and *Entamoeba Dispar* DNA from stool samples, Am. J. Trop. Med. Hyg., 64 (5, 6) : 293–297.

Zeibig ,E. A. (1997). Clinical parasitology: A practical approach. Second edition, Philadelphia: Saunders, PP: 320.