



التصنيف الجزيئي لطفيليات *Entamoeba spp.* في محافظة القادسية ، العراق

م.د. هبة رياض جميل العبودي

أ.د. هادى مدلوى المپالى

كلية العلوم / جامعة القادسية

Hiba.Al-abodi@qu.edu.iq

كلية التربية / جامعة القادسية

Hadi.Hamza@qu.edu.iq

الخلاصة :

تضمنت الدراسة الحالية استخدام طريقة DNA sequencer لغرض التأكيد من تشخيص عزلات انواع *E. histolytica*, *E. dispar* and *E. moshkovskii* و تسجيل البيانات عالميا في Gen Bank و معرفة اي العزلات الموجودة في العالم المشابهة تماما للعزلات العراقية ، حيث خضعت 20 عينة غائط لمرضى امراض المخ والأعصاب لعملية الفحص المجهرى للتتأكد من وجود الطفيلي او لا ثم خضعت للفحص الجزيئي باستخدام تقنية البلمرة التسلسلي التقليدي Polymerase Chain Reaction و اثبتت النتائج امتلاك (13) عزلة بواقع 5 عزلات للنوعين *E. histolytica* E. *dispar* وثلاث عزلات للنوع *E. moshkovskii* (المرحلة كهربائيا على هلام الأكاروز لمورثة 18S ribosomal RNA التي تمثل الموروث التشخيصي للأنواع الثلاث ثم ارسل ناتج التفاعل PCR الى شركة Bioneer في كوريا الجنوبية وذلك لإجراء تسلسل الحمض النووي باستخدام جهاز NCBI-Genbank (AB DNA sequencing system). وقد تم استخدام برنامج قاعدة بيانات ال Blast Alignment tool وبرنامج MEGA6 (MEGA6) لتحليل نتائج تسلسلات عزلات الطفيلي وتحديد الشجرة التطورية لأنواع الاميبا قيد الدراسة والكشف ايضا عن تتبع القواعد النتروجينية لمورثة 18s r RNA في العينات المدرسسة. وبما أنه لا يوجد لدراسات سابقة في العراق حول تحليل تتبع القواعد النتروجينية لعزلات الأنواع التسلسلي في قاعدة البيانات في المركز الوطني للمعلومات NCBI الخاص بينك الجينات وتم الحصول على الأرقام KP233839, KP233840, KP233838 KP233836 KP233837 KP233837 و KP722596 و KP722597, KP722598 و KP722599 و KP7225600 و KP7225601 و KP7225602 و KP7225603 و KP7225604 للنوع *E. histolytica* *E. dispar* *E. moshkovskii* فقد قمنا بتسجيل العينات التي خضعت للتوصيف الجزيئي التأكيدى في قاعدة البيانات في المركز الوطني للمعلومات NCBI الخاص بينك الجينات وتم الحصول على الأرقام KP722596 و KP722597, KP722598 و KP722599 و KP7225600 و KP7225601 و KP7225602 و KP7225603 و KP7225604 للنوع *E. histolytica* *E. dispar* *E. moshkovskii* وقد تبين من نتائج اصطفاف القواعد النتروجينية وتحليل الشجرة الوراثية للأنواع التي استهدفتها الدراسة الحالية بأنها كانت اقرب وراثيا للعينة المعبرة عن النوع *E. dispar* والتي سجل وجودها جورجيا و ايطاليا وفي سدني في استراليا بالنسبة للنوع *E. histolytica* وكذلك للعينة التي المعبرة عن النوع *E. histolytica* والتي سجل وجودها في طوكيو في اليابان و الدنمارك والعزلات المسجلة في لندن.

الكلمات المفتاحية: Entamoeba spp., DNA sequenser, NCBI

*البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الثاني

المقدمة

تعد الطفيليات من المسببات المرضية الاحيائية التي لا يقل تأثيرها عن البكتيريا والفايروسات والفطريات ، اذ تصيب اعضاء من جسم الكائن الحي ، وتنتشر الطفيليات المعاوية على وجه الخصوص بشكل واسع في العالم [1]، ومن الطفاليات الابتدائية الممرضة ما يتمتي الى جنس *Entamoeba* وان الاصابة بأنواع الامبيا اما ينبع عنه تكونين مستعمرات غير مؤدية في الاماء او غزو جدران القولون أو تحطيم أنسجة المضيف على سبيل المثال الرئة ، الكبد ، الدماغ مسببة بذلك داء الامبيات amoebiasis ومن الجدير بالذكر ان معظم أنواع الامبيا تعد طفاليات متغايرة في تجويف الاماء ولا تسبب امراض للانسان [2] ، وتعرف طريقة DNA Sequencer بـ (تسلسل الحمض النووي) بأنها عملية تحديد الترتيب الدقيق للنيوكليوتيدات داخل جزيء DNA، ويشمل أي وسيلة أو تقنية يتم استخدامها لتحديد الترتيب من أربع قواعد-الأدينين، الجوانين والسيتوزين والثايمين في شريطي الحامض النووي، وان ظهور أساليب تسلسل الحامض النووي السريعة قد سارعت بشكل كبير في الأبحاث البيولوجية والطبية والاكتشافات العلمية [3]. يمكن استخدام تسلسل الحمض النووي لتحديد تسلسل الجينات الفردية، ويوفر تسلسل



ترتيب النيوكليوتيدات الفردية الموجودة في جزيئات DNA أو RNA المعزلة من الحيوانات والنباتات والبكتيريا أو تقريباً أي مصدر آخر للمعلومات الوراثية و هذه المعلومات مفيدة لمختلف مجالات البيولوجيا وغيرها من العلوم، والطب، والطب الشرعي، وغيرها من مجالات الدراسة [4] وقد تطورت طريقة تقدير القواعد البينية من oligonucleotide الى طرق حديثة مثل capillary electrophoresis وذلك لتقدير القواعد التتروجينية في الحمض النووي DNA [5] و من الجدير بالذكر ان المسودة الأولية لسلسل الجينوم للنوع *E. histolytica* قد أكتمل بشكل أولي وأستعمل في التجارب في المختبرات البحثية عام 2005 وبعد ذلك تم التعرف على سلسل الجينوم للنوع *E. dispar* وبمقارنة السلالتين وملاحظة درجة التشابه في التسلسل الجيني أطلق عليهما أسم التوائم غير المتماثلة [6,7]، وتمت دراسة التسلسل الجيني للنوع *E. moshkovskii*. وظهر بأنه ذو صلة وراثية جينية مباشرة قريبة جداً من السلالتين المذكورتين [7] وتبلغ النسبة المئوية لسلسل المتشابه في المناطق المشفرة من الجينات حوالي 95 % اما في المناطق غير المشفرة فنسبة التسلسل المتشابه بلغت 80 % بين كل من النوعين *E. histolytica* والنوع *E. moshkovskii* . وأن نسبة التغير ضمن النوع *E. moshkovskii* يبدو أقل من 1 % وهذا سمح بعمليّة تصميم العديد من البادئات واستخدامها في الدراسات الجزيئية التشخيصية باستخدام تقنية PCR [8] .

المواد وطرق العمل Materials and Methods

1- جمع العينات Samples collection

جمعت 20 عينة براز من المرضى المراجعين لمستشفى الشامية العام وثلاث من المراكز الصحية الاولية في قضاء الشامية التابع لمحافظة القادسية الذين يعانون من حالات اسهال وللفترة من شهر تموز 2016 وحتى نهاية شهر كانون الاول 2017 ثم وضعت العينات في علب بلاستيكية نظيفة ومعقمه ومزوده كذلك بأغطية محكمة لمنع جفاف العينة، بعد ذلك جلت العينات الى مختبر في كلية العلوم /جامعة القادسية وفحصت بأسرع وقت ممكن لتجنب تأخير العينات الذي يؤدي الى اختفاء الاطوار النشطة فيصعب تمييزها [9] وبعد الانتهاء من الفحص والمجهرى حفظت عينات الغائط في درجة 20- م لغاية اجراء الفحص الجزيئي عليها.

2- فحص العينات Samples examination

أ- الفحص المجهرى - Microscopic examination

تم استخدام طريقة (المسحة المباشرة Direct smear method) وتضمنت وضع قطرة من محلول الملحى الفسيولوجي (0.9%) على الشريحة الزجاجية وكذلك قطرة اخرى من محلول (الليود المائي Lugol's Iodine) وقد اخذت العينات من اماكن مختلفة من النموذج لزيادة احتمالية ظهور الطفيلي في حالة وجود الطفيلي [10] ، تلا ذلك فحص الشريحة تحت المجهر الضوئي باستعمال قرتي التكبير الصغرى والكبرى.

ب- البادئات المستخدمة في فحص النموذج DNA Sequencer Primers

صممت البادئات لفحص التسلسل النووي الخاص بجين 18S rRNA المسؤول عن تشخيص أنواع طفيلي *Entamoeba* باستخدام تقنية ال DNA Sequencer حيث تم استخدام موقع بنك الجينات Genbank-NCBI للحصول على التسلسل الكامل للجين 18S rRNA gene بكل نوع من أنواع طفيلي *Entamoeba* وباستخدام برنامج Primer3plus في تصميم البادئات وقد جهزت البادئات من قبل شركة Pioneer الكورية:



الجدول (1): يمثل البادئات التي استخدمت في هذه الدراسة مع تسلسلها النيوكليريني ونتائج فحص PCR:

Primer	Sequence		AMPLICOM
<i>E. histolytica</i>	F	AACTGCGGACGGCTCATTAT	1742bp
	R	TTCAATCGGTAGGAGCGACG	
<i>E. dispar</i>	F	ATCTGGTTGATCCTGCCAGT	1795bp
	R	AAAGGGCAGGGACGTATTCA	
<i>E.moshkoviskii</i>	F	AAACTGCGGACGGCTCATTA	1743bp
	R	TTCAATCGGTAGGAGCGACG	

1- طريقة

1- طريقة تسلسل الحمض النووي DNA sequencer method

تم إجراء طريقة تسلسل الحمض النووي لتحديد العلاقة الوراثية Phylogenetic tree analysis لأنواع طفيلي *Entamoeba* sp. وذلك بتحديد تسلسل نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين 18S rRNA الخاص بكل نوع ، وذلك باستخدام البادئات لتفاعل البلمرة التسلسلي PCR المصممة لفحص DNA sequencer وتشمل عدة خطوات:

1- تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام عدة AccuPower® PCR PreMix المجهزه من قبل شركة Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة كالتالي حيث حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة في أنابيب PCR المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة وضفت المكونات الأخرى لمزيج تفاعل وحسب تعليمات الشركة . كما في الجدول (2):

الجدول (2) أداة الذي يوضح مكونات مزيج PCR master mix .

الحجم Volume	PCR master mix المزيج
5μL	قالب DNA
1.5μL	البادئ الامامي (10pmol)
1.5μL	البادئ العكسي (10pmol)
12μL	ماء PCR
20μL	Total

بعد اكمال تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة تم غلق الانابيب ومرجت بعناية بجهاز المازج vortex لمدة 5 ثوانى نقلت الأنابيب لجهاز المدور الحراري PCR Thermocycler لأجراء حالات الدورات الحرارية PCR . thermocycler conditions



2- حالات الدورات الحرارية

تم جراء فحص ال PCR باستخدام جهاز PCR Thermocycler. وتم برمجة الجهاز كما في الجدول (3):

جدول (3) حالات الدورات الحرارية

PCR Step	الخطوات	درجة الحرارة Temperature	وقت Time	عدد الدورات Repeat cycle
بدء المسخ		95C	5min	1
المسخ او الانفصال		95C	5sec.	
الالتحام او الالتصاق		58C	30sec	30
التمدد او البناء		72C	3min	
التمدد النهائي		72C	10min	1
Hold		4C	Forever	-

3 الترхيل الكهربائي في الهلام Gel electrophoresis

تم اجراء الترхيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز بتراكيز 1.5% وذلك لقراءة ناتج تفاعل سلسلة البمره PCR product analysis وذلك باذابة 1.5 غ من هلام الاكاروز gel في 100 مل من محلول ال TBE buffer الدارى بتراكيز X1 وباستخدام الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة 15 دقيقة. ثم ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50°C وبعدها تم إضافة صبغة الأثيريوم بروماید المشعة Ethidium bromide ومزجت جيدا مع الهلام. ثم صب هلام الاكاروز في قالب الترخيل Tray الحاوي على المشط Comb لتحديد أماكن عينات PCR، وبعد ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ومن ثم ازيل المشط من الهلام بعناية. ثم استخدم سلم القياس 100 DNA ladder لقياس ناتج PCR. وتحميل عينات ناتج PCR على مايكروليتر لكل عينة. وبعد اكتمال عملية التحميل تم غمر هلام الاكاروز باستخدام محلول Buffer الدارى TBE Buffer بتراكيز X1 وغلق غطاء الترخيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترخيل باستخدام تيار 100 فولت و 80 أمبير لمدة ساعة واحدة. وبعد انتهاء عملية الترخيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج PCR باستخدام مصدر الاشعة فوق البنفسجية U.V light source لتحديد النتائج الموجبة لمطابقتها مع الحامض النووي القياسي DNA Ladder.

4- طريقة التتابع الجيني لحامض DNA Sequencer

بعد اجراء فحص PCR تم ارسال ناتج تفاعل PCR product الى شركة Bioneer في كوريا الجنوبية وذلك لأجراء تسلسل الحمض النووي باستخدام جهاز (AB DNA sequencing system). وقد تم استخدام برنامج قاعدة بيانات ال NCBI-Genbank-Blast Alignment tool وبرنامج MEGA6 (لتحليل نتائج تسلسلات عزلات الطفيلي وتحديد الشجرة التطورية لأنواع الاميبا قيد الدراسة والكشف ايضا عن تتابع القواعد التنروجينية لمورثة 18s r RNA في العينات المدروسة).

5- التحليل الاحصائي

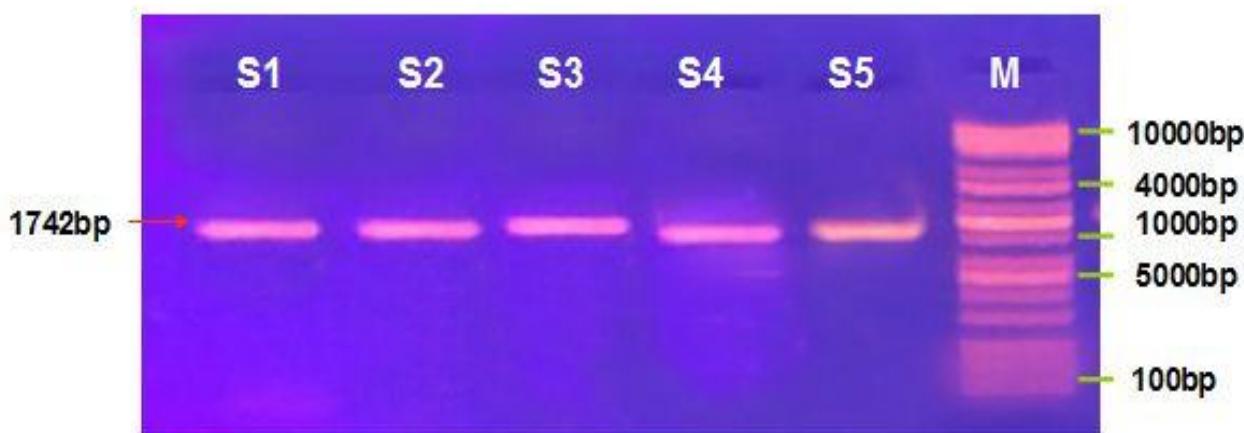
اخضعت جميع النتائج التي تم الحصول عليها في هذه التحليل الاحصائي باستخدام اختبار مربع كاي Chi square - وبينت مستوى الاحتمالية عند ($p \leq 0.05$) [11].



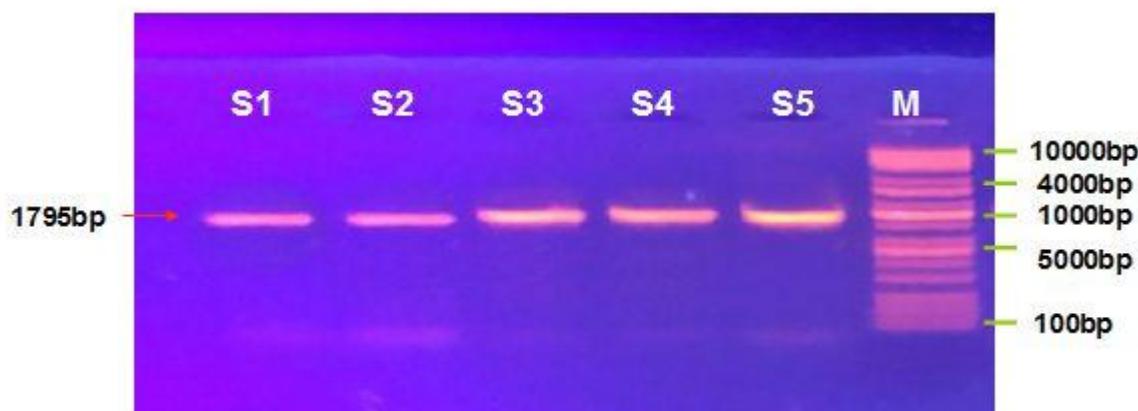
النتائج
 طريقة DNA sequencer :

1: تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة التقليدي (PCR)

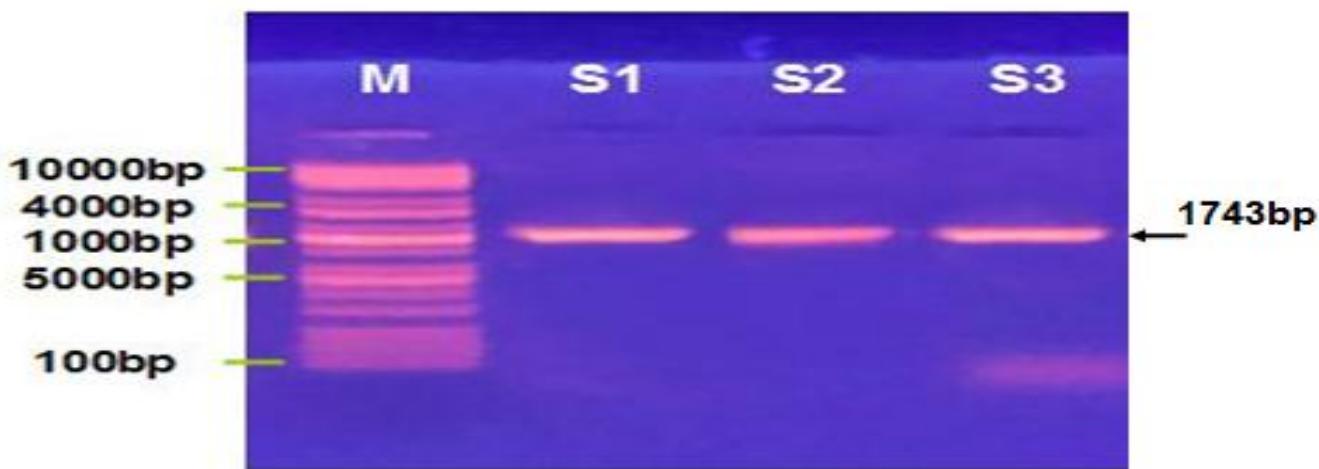
اظهرت الدراسة الجزيئية باستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي PCR امتلاك 5 عزلات للنوع *E. dispar* و 5 عزلات للنوع *E. histolytica* وثلاث عزلات للنوع *E. moshkoviskii* في المرحلة كهربائيًا على هلام الأكاروز لمورثة 18S ribosomal RNA التي تمثل الموروث التشخيصي للأنواع الثلاث بالحجم الجزيئي (1742 bp) زوج قاعدي (bp) للنوع *E. histolytica* وكما هو موضح بالشكل (1)، والحجم الجزيئي (1795 bp) للنوع *E. dispar* كما في الشكل (2)، والحجم الجزيئي (1743 pb) للنوع *E. moshkoviskii* كما موضح بالشكل (3)، مما يثبت عيانية جميع العزلات إلى الانواع المشخصة فعليا.



الشكل (1): الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين 18S rRNA gene حيث يمثل S1-S5 عينات الموجبة للفحص لجين 18S rRNA gene . 1742bp تمثل بعض العينات المشخصة طيفياً *E.histolytica* و رقم M: Marker ladder 10000-100bp



الشكل (2): الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين 18S rRNA gene حيث يمثل S1-S5 عينات الموجبة للفحص لجين 18S rRNA gene . 1795bp تمثل بعض العينات المشخصة طيفياً *E.dispar* و رقم M: Marker ladder 10000-100bp



الشكل رقم (3): الترحيل الكهربائي لهلام الاكروز والحاوي على نتائج فحص ال PCR لجين ال 18S rRNA gene الخاص بتشخيص طفيلي *E. moshkovskii* حيث يمثل M: Marker ladder 10000-100bp و رقم S1-S3 تمثل بعض العينات الموجبة للفحص لجين 18S rRNA gene بناتج 1743bp

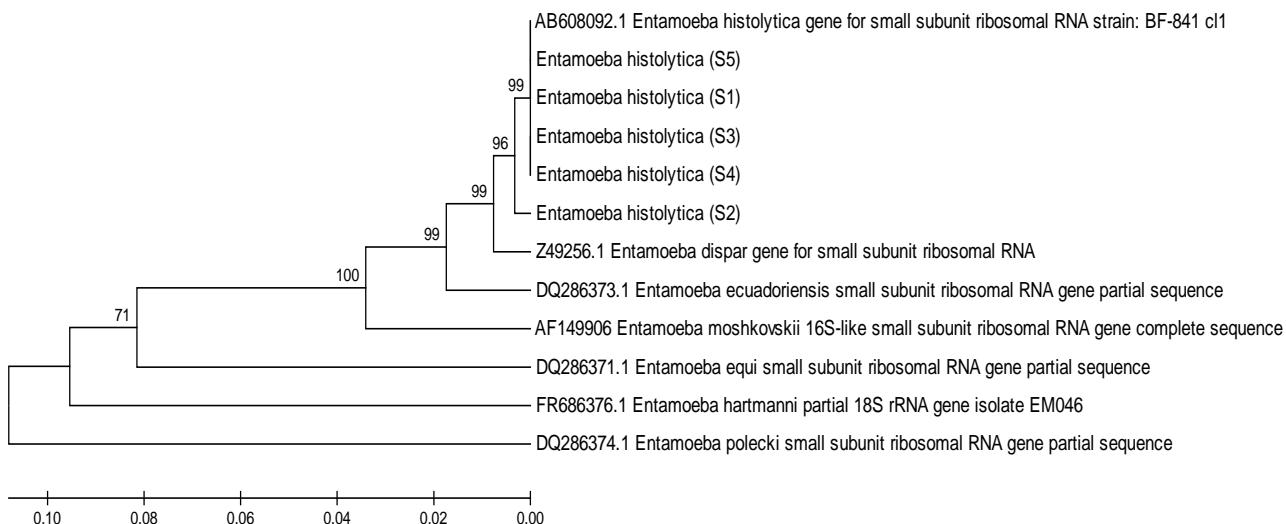
2- تحليل الشجرة التطورية لأنواع جنس *Entamoeba* قيد الدراسة

باستخدام برنامج MEGA6 (MEGA6) وبالاعتماد على نتائج فحص PCR التقليدي لجين 18s rRNA لأنواع الامبيا بالنسبة للنوع *E. histolytica* اثبتت النتائج ان التشابه واضح لاصطفاف القواعد التتروجينية مع العزلات العالمية التي تحمل الأرقام التسلسلية DQ286374.1, DQ2863673, DQ286371.1, AF149906, AB608092.1, FR686376.1, Z49256.1 والشكل (4) يمثل تحليل متعددة اصطاف تسلسل القواعد الجينية في حين يمثل الشكل (5) تحليل الشجرة الوراثية للمقارنة بين الانواع العقيده الدراسه والانواع المنتشرة في العالم المسجلة في موقع بنك الجينات NCBI-Genbank، اما بالنسبة للنوع *E. dispar* اثبتت النتائج ان التشابه واضح لاصطفاف القواعد التتروجينية مع نفس العزلات العالمية التي تحمل الأرقام التسلسلية المذكورة مسبقا والشكل (6) يمثل تحليل متعددة اصطاف تسلسل القواعد الجينية لنفس النوع، في حين يمثل الشكل (7) تحليل الشجرة الوراثية للمقارنة بين الانواع المدروسة حاليا و الانواع المسجلة عالميا في موقع بنك NCBI-Genbank، وقد اثبتت النتائج ان التشابه واضح لاصطفاف القواعد التتروجينية للنوع *E. moshkovskii* مع نفس العزلات العالمية التي تحمل الأرقام التسلسلية المذكورة مسبقا والشكل (8) يمثل تحليل متعددة اصطاف تسلسل القواعد الجينية في حين يمثل الشكل (9) تحليل الشجرة الوراثية للمقارنة بين الانواع المدروسة حاليا و الانواع المسجلة عالميا في موقع بنك الجينات NCBI-Genbank :



Species/Abbrv	Gr	Sequence
1. AB608092.1 Entamoeba histolytica gene for small subunit ribosomal RNA	A	ATTAATCAGGACCGAACTTGGGGTCGAGAGCCATCAGATCGCTGTAGGCTTACTATGACCTTGTCRACCAAG
2. AF149906 Entamoeba moshkovskii 16S-like small subunit ribosomal RNA	A	ATTAATCAGGACCGAACTTGGGGTCGAGAGCCATCAGATCGCTGTAGGCTTACTATGACCTTGTCRACCAAG
3. DQ286371.1 Entamoeba equi small subunit ribosomal RNA	A	ATTAATCAGGACCGAACTTGGGGTCGAGAGCCATCAGATCGCTGTAGGCTTACTATGACCTTGTCRACCAAG
4. DQ286373.1 Entamoeba ecuadorensis small subunit ribosomal RNA	A	ATTAATCAGGACCGAACTTGGGGTCGAGAGCCATCAGATCGCTGTAGGCTTACTATGACCTTGTCRACCAAG
5. DQ286374.1 Entamoeba polecki small subunit ribosomal RNA	T	TITGATGAGGACCGAACTTGGGGTCGAGAGCCATCAGATCGCTGTAGGCTTACTATGACCTTGTCRACCAAG
6. Entamoeba histolytica (S1)	A	ATTAATCAGGACCGAACTTGGGGTCGAGAGCCATCAGATCGCTGTAGGCTTACTATGACCTTGTCRACCAAG
7. Entamoeba histolytica (S2)	A	ATTAATCAGGACCGAACTTGGGGTCGAGAGCCATCAGATCGCTGTAGGCTTACTATGACCTTGTCRACCAAG
8. Entamoeba histolytica (S3)	A	ATTAATCAGGACCGAACTTGGGGTCGAGAGCCATCAGATCGCTGTAGGCTTACTATGACCTTGTCRACCAAG
9. Entamoeba histolytica (S4)	A	ATTAATCAGGACCGAACTTGGGGTCGAGAGCCATCAGATCGCTGTAGGCTTACTATGACCTTGTCRACCAAG
10. Entamoeba histolytica (S5)	A	ATTAATCAGGACCGAACTTGGGGTCGAGAGCCATCAGATCGCTGTAGGCTTACTATGACCTTGTCRACCAAG
11. FR686376.1 Entamoeba hartmanni partial 18S rRNA	A	ATTAATCAGGACCGAACTTGGGGTCGAGAGCCATCAGATCGCTGTAGGCTTACTATGACCTTGTCRACCAAG
12. Z49256.1 Entamoeba dispar gene for small subunit ribosomal RNA	A	ATTAATCAGGACCGAACTTGGGGTCGAGAGCCATCAGATCGCTGTAGGCTTACTATGACCTTGTCRACCAAG

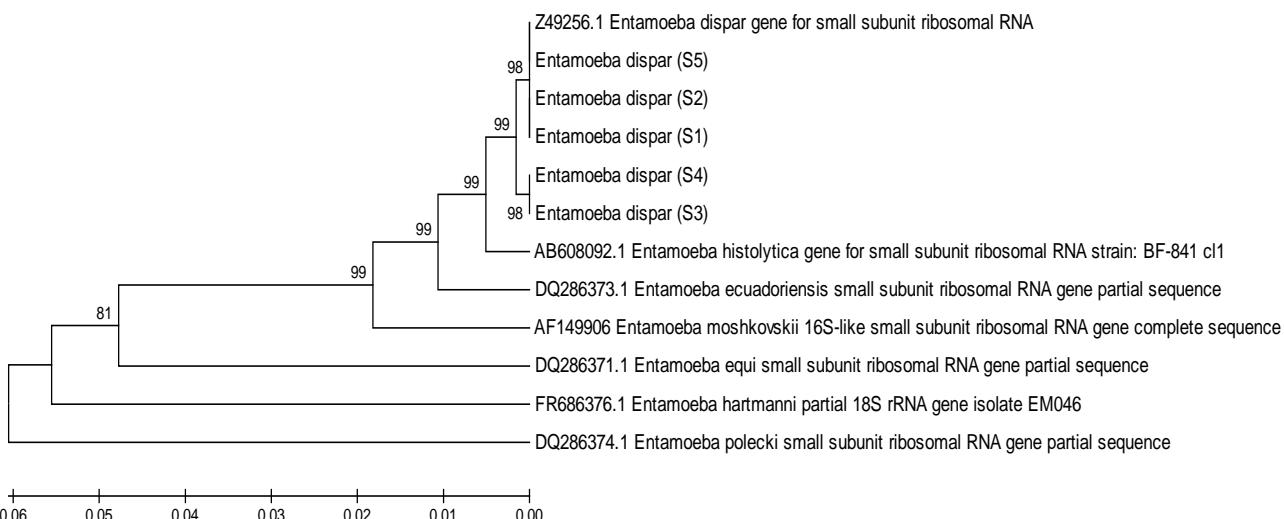
(4): يمثل تحليل متعدد اصطفاف تسلسل القواعد الجينية (Multiple sequence alignment analysis) باستخدام برنامج (MEGA6) لنتائج فحص تفاعل تسلسل البلمرة PCR لجين small subunit ribosomal RNA في طفيلي Entamoeba histolytica ، حيث يلاحظ التشابه الواضح لاصطفاف تسلسل القواعد لجين (ssuRNA gene) في طفيلي Local Entamoeba histolytica مع بقية مجموعة من أنواع جنس Entamoeba طفيلي المسجلة في موقع بنك الجينات NCBI-Genbank الظاهر في الصورة.



(5): يمثل تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis باستخدام برنامج (MEGA 6) حيث تم استخدام تحليل الشجرة الوراثية من نوع (Test UPGMA tree) (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) حيث أظهرت نتائج التحليل وجود تقارب واضح في عينات طفيلي Local Entamoeba histolytica مع (AB608092.1) Entamoeba histolytica isolate بالمقارنة مع بقية الأنواع الأخرى الظاهرة في تحليل لشجرة الوراثية.

Species/Abbrv	Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. AB608092.1 Entamoeba histolytica gene for small subunit rRNA		T	T	A	T	C	A	G	A	C	G	A	T
2. AF149906 Entamoeba moshkovskii 16S-like small subunit rRNA		T	T	A	T	C	A	G	A	C	G	A	T
3. DQ286371.1 Entamoeba equi small subunit ribosomal RNA		T	T	A	T	C	A	G	A	C	G	A	T
4. DQ286373.1 Entamoeba ecuadorensis small subunit rRNA		T	T	A	T	C	A	G	A	C	G	A	T
5. DQ286374.1 Entamoeba polecki small subunit rRNA		T	T	A	T	C	A	G	A	C	G	A	T
6. Entamoeba dispar (S1)		T	T	A	T	C	A	G	A	C	G	A	T
7. Entamoeba dispar (S2)		T	T	A	T	C	A	G	A	C	G	A	T
8. Entamoeba dispar (S3)		T	T	A	T	C	A	G	A	C	G	A	T
9. Entamoeba dispar (S4)		T	T	A	T	C	A	G	A	C	G	A	T
10. Entamoeba dispar (S5)		T	T	A	T	C	A	G	A	C	G	A	T
11. FR686376.1 Entamoeba hartmanni partial 18S rRNA		T	T	A	T	C	A	G	A	C	G	A	T
12. Z49256.1 Entamoeba dispar gene for small subunit rRNA		T	T	A	T	C	A	G	A	C	G	A	T

(الشكل 6): يمثل تحليل متعددة اصطاف تسلسل القواعد الجينية (Multiple sequence alignment analysis) باستخدام برنامج MEGA لفحص تفاعل تسلسل البلمرة PCR لجين small subunit ribosomal RNA (ssrRNA gene) في طفيلي *Entamoeba dispar*, حيث يلاحظ التشابه الواضح لاصطاف تسلسل القواعد لجين (ssrRNA gene) في طفيلي Local *Entamoeba dispa* مع بقية مجموعة أنواع جنس طفيلي *Entamoeba* المسجلة في موقع بنك الجينات NCBI-Genbank الظاهر في الصورة.



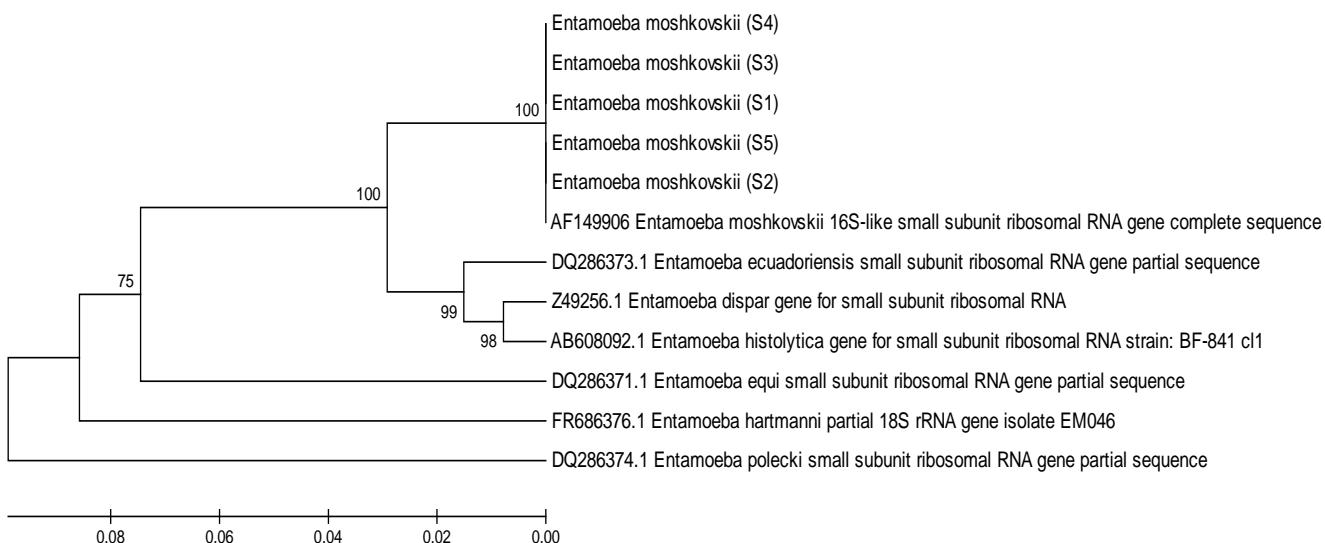
الشكل (7) : يمثل الشكل اعلاه تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis باستخدام برنامج (6) MEGA حيث تم استخدام تحليل الشجرة الوراثية من نوع (Test UPGMA) tree

(AB608092.1) بالمقارنة مع بقية الأنواع الأخرى الظاهرة في تحليل شجرة الوراثية. واضح في عينات طفيلي *Entamoeba dispar* المحلية مع (*Entamoeba dispar* isolate) اذ أظهرت نتائج التحليل وجود تقارب Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)



Species/Abbrv	Group	Δ	Sequence
1. AB608092.1 Entamoeba histolytica gene for small subunit		*	TTAATGGGTAGGGGCGAAGGGCGTTTGTGTTGTTGGTGGAGGATTTGTTAGGTTATTCGGGTACGAAACGGAATC
2. AF149906 Entamoeba moshkovskii 16S-like small subunit r		***	TTAATGGGTAGGGGCGAAGGGCGTTTGTGTTGTTGGTGGAGGATTTGTTAGGTTATTCGGGTACGAAACGGAATC
3. DQ286371.1 Entamoeba equi small subunit ribosomal RNA g		*****	TTAATGGGTAGGGGCGAAGGGCGTTTGTGTTGTTGGTGGAGGATTTGTTAGGTTATTCGGGTACGAAACGGAATC
4. DQ286373.1 Entamoeba ecuadorensis small subunit ribosom		*****	TTAATGGGTAGGGGCGAAGGGCGTTTGTGTTGTTGGTGGAGGATTTGTTAGGTTATTCGGGTACGAAACGGAATC
5. DQ286374.1 Entamoeba polecki small subunit ribosomal R		*****	ATGATGGGTAGGGGCGAAGGGCGTTTGTGTTGTTGGTGGAGGATTTGTTAGGTTATTCGGGTACGAAACGGAATC
6. Entamoeba moshkovskii (S1)		*	TTAATGGGTAGGGGCGAAGGGCGTTTGTGTTGTTGGTGGAGGATTTGTTAGGTTATTCGGGTACGAAACGGAATC
7. Entamoeba moshkovskii (S2)		***	TTAATGGGTAGGGGCGAAGGGCGTTTGTGTTGTTGGTGGAGGATTTGTTAGGTTATTCGGGTACGAAACGGAATC
8. Entamoeba moshkovskii (S3)		*****	TTAATGGGTAGGGGCGAAGGGCGTTTGTGTTGTTGGTGGAGGATTTGTTAGGTTATTCGGGTACGAAACGGAATC
9. Entamoeba moshkovskii (S4)		*****	TTAATGGGTAGGGGCGAAGGGCGTTTGTGTTGTTGGTGGAGGATTTGTTAGGTTATTCGGGTACGAAACGGAATC
10. Entamoeba moshkovskii (S5)		*****	TTAATGGGTAGGGGCGAAGGGCGTTTGTGTTGTTGGTGGAGGATTTGTTAGGTTATTCGGGTACGAAACGGAATC
11. FR686376.1 Entamoeba hartmanni partial 18S rRNA gene :		*	TTAATGGGTAGGGGCGAAGGGCGTTTGTGTTGTTGGTGGAGGATTTGTTAGGTTATTCGGGTACGAAACGGAATC
12. Z49256.1 Entamoeba dispar gene for small subunit ribos		*****	TTAATGGGTAGGGGCGAAGGGCGTTTGTGTTGTTGGTGGAGGATTTGTTAGGTTATTCGGGTACGAAACGGAATC

الشكل (8): يمثل تحليل متعدد اصطاف تسلسل القواعد الجينية (Multiple sequence alignment analysis) باستخدام برنامج MEGA6 لنتائج فحص تفاعل تسلسل البلمرة لجين small subunit ribosomal RNA في طفيلي Entamoeba moshkovskii. حيث يلاحظ التشابه الواضح لاصطاف تسلسل القواعد لجين (ssrRNA gene) في طفيلي Local Entamoeba moshkovskii مع بقية مجموعة من أنواع جنس طفيلي Entamoeba المسجلة في موقع بنك الجينات NCBI-Genbank الظاهر في الصورة.



الشكل (9): يمثل تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis (MEGA 6) حيث تم استخدام تحليل الشجرة الوراثية من نوع (UPGMA tree) (Test Unweighted Pair Group Method (UPGMA tree)) حيث أظهرت نتائج التحليل وجود تقارب واضح في عينات طفيلي Local Entamoeba dispar مع (AB608092.1) Entamoeba dispar isolate بالمقارنة مع بقية الأنواع الأخرى الظاهرة في تحليل لشجرة الوراثية.



وبما أنه لا وجود لدراسات سابقة في العراق حول تحليل تتابع القواعد النتروجينية لعزلات الأنواع *E. histolytica* فقد قمنا بتسجيل العينات التي خضعت للتصنيف الجزيئي التأكيدى في قاعدة البيانات في المركز الوطني للمعلومات NCBI الخاص بينك الجينات وتم الحصول على الأرقام التسلسلية الموضحة في الجدول (1) :

الجدول (1) (الأرقام التسلسلية Accession NO. للعزلات قيد الدراسة في المركز الوطني للمعلومات NCPI

رقم العينة	النوع	الرقم التسلسلي
S1	<i>E.histolytica</i>	KP233836
S2	<i>E.histolytica</i>	KP233837
S3	<i>E.histolytica</i>	KP233838
S4	<i>E.histolytica</i>	KP233839
S5	<i>E.histolytica</i>	KP233840
S1	<i>E. dispar</i>	KP722596
S2	<i>E. dispar</i>	KP722597
S3	<i>E. dispar</i>	KP722598
S4	<i>E. dispar</i>	KP722599
S5	<i>E. dispar</i>	KP7225600
S1	<i>Moshkovskii E.</i>	KP7225601
S2	<i>Moshkovskii E</i>	KP7225602
S3	<i>Moshkovskii E</i>	KP7225603

المناقشة

تبين من نتائج اصطفاف القواعد النتروجينية وتحليل الشجرة الوراثية للأنواع التي استهدفتها الدراسة الحالية بأنها كانت أقرب وراثياً للعينة التي تحمل الرقم التسلسلي z49256.1 المعتبرة عن النوع *E. dispar* والتي سجل وجودها جورجياً من قبل [12] وهي مماثلة جينياً للعينات التي سجل وجودها في إيطاليا من قبل [13] وما سجله [14] في سدني في استراليا [15] في إيطاليا، وكذلك للعينة التي تحمل الرقم التسلسلي AB608092.1 المعتبرة عن النوع *E. histolytica* والتي سجل وجودها في طوكيو في اليابان من قبل [16] والعينة بالرقم التسلسلي FR686376.1 المسجلة في الدنمارك [17] والعزلات DQ286373.1, DQ286371.1 المسجلة في لندن من قبل [18].



إنَّ الغرض من الـ DNA sequencer هو تأكيد لعزالتنا للأنواع الثلاث للطفلبي بالإضافة إلى معرفة مع من يكون تشابهها من بين العزلات العالمية. وهذه النتائج تؤكد صحة تشخيص العزلات قيد الدراسة الحالية بعد مقارنتها مع عزلات قياسية عالمية لمعرفة تسلسل القواعد التتروجينية لمورثة 18S rRNA التي تمثل المورثة المرجعية (Reference gene) لتشخيص العزلات. وإن التشخيص الدقيق على المستوى الجزيئي المتمثل بمعرفة التشابه لـ DNA العزلات له فائدة تشخيصية فضلاً عن إمكانية لاستخدام بعضًا من هذه العزلات في التطبيقات العملية كمعززات حيوية أو دوائية أو في استخدامها لدراسات الوراثة الجزيئية لا سيما أنه لا توجد دراسات سابقة حول تحليل تتابع القواعد التتروجينية لـ *E. moshkoviskii* وبالتالي الإستفادة منها في قاعدة البيانات ضمن موقع NCBI الخاص ببنك الجينات العالمي (Gene Bank).

المصادر:

- 1- [1] Gracia , S.m ., de Giacoma , M. Aulicino , I. M . and Pazio , E. (2003) . Giardia cysts in waste water treatment plants in Italy . Applied environmental microbiology . . Vol .69 , pp : 3393-3398
- [2] Hamzah , Z. Petmiter , S. Mangthin , M ., Leelayoova , S. and Chavalitsh –Winkoon , P. (2006) . differential detection of *Entamoeba histologica* , *Entamoeba dispar* and *E.Moshicoviskii* by single –round PCR assay .J. clin . microbial ., 4 : 3196 -3200.
- [3] Hall, BG. (2004). Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, MA
- [4] Morrison ,D. A. (2009). Evolution of the Apicomplexa: where are We Now? Trends Parasitol. 25 (Suppl. 8), 375-382
- [5] Linder, C. R. and Warnow, T. (2005). “An Overview of Phylogeny Reconstruction.” In the Handbook of Computational Molecular Biology, Chapman and Hall/CRC Computer & Information Science .
- [6] Sterling , C. R. and Adam , R.D. (2004) . The Pathogenic enteric Protoza : Giardia , Entamoeba , Cryptosporidium , and Cyclospora . New York . Vol (8) : 16 – 22
- [7] Clark , C. G. and Dimond , L. S. (1997). Intraspecific variation phylogenetic relationships in the genus Entamoeba as revealed riboprinting . J. Eukaryot . Microbiol. 44:142 – 154.
- [8] Ghosh, S.; Frisardi, M.; Ramirez-Avila, L.; Descoteaux, S.; Sturm-Ramirez, K.; Newton-Sanchez, O.A.; Santos-Preciado, J.I.; Ganguly, C.; Lohia, A.; Reed, S.; Samuelson, J. (2000). Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: evidence of a bottleneck (Demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. J Clin Microbiol 38:3815–3821.
- [9] Swash, M. (1997).Hutchison's clinical methods 20Ed., W. B. Saunders Co., Ethmethods, Philad- -phia:438 pp.
- [10] Turgeon, D.K. & Fritzsche, T.R.(2001).Laboratory approaches toinfectiousdiarrhea. Gastroenterol. Clin. 30(3):7-22.
- [11] Petri , A. and Watson , P.(2004) . Statistics for veterinary and animals science . Illustrated by preparation by Alexander Hunde. J. Int. Lid. Cornwall.



- [12] Qvarnstrom, Y., James, C., Xayavong, M., Holloway, B. P., Visvesvara, G. S., Sriram, R. and Silva, A. J. (2005). Comparison of real time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5491-5497. doi: 10.1128/jcm.43.11.5491-5497-2005
- [13] Chang SY., Sun HY., Ji DD., Lo YC., Wu CH., Wu PY., Liu WC., Hung CC., Chang SC. (2008) . Cost-effectiveness of detection of intestinal amebiasis by using serology and specific - amebic-antigen assays among persons with or without human immunodeficiency virus infection.J. Clin. Microbiol. 46(9): 3077-3079
- [14] Stark D., van Hal S., Fotedar R., Butcher A., Marriott D., Ellis J., Harkness J.(2008). Comparison of stool antigen detection kits to PCR for diagnosis of amebiasis. J. Clin. Microbiol. 46(5): 1678-1681 .
- [15] Calderaro A., Piergiani M., Buttrini M., Montecchini S., Piccolo G., Gorrini C., Rossi S., Chezzi C., Arcangeletti MC., Medici MC., De Conto F.(2015). MALDI-TOF mass spectrometry for the detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*.PLoS ONE 10(4): e0122448.
- [16] Suzuki J., Kobayashi S., Imada M., Tolba ME., Takeuchi T.(2011). Characterization of a novel *Entamoeba histolytica* strain from Burkina Faso, Africa, possessing a unique hexokinase-2 gene., Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Tokyo, Japan.Parasite 18(4): 287-294 .
- [17] Stensvold CR., Lebbad M., Victory EL., Verweij JJ., Tannich E., Alfellani M., Legarraga P., Clark CG.(2011). Increased sampling reveals novel lineages of *Entamoeba*: consequences of genetic diversity and host specificity for taxonomy and molecular detection. Statens Serum Institut, Artillerivej 3, DK-2300 Copenhagen S, Denmark.Protist 162(3): 525-541
- [18] Clark CG., Kaffashian F., Tawari B., Windsor JJ., Twigg-Flesner A., Davies-Morel MC., Blessmann J., Ebert F., Peschel B., Le Van A., Jackson CJ., Macfarlane L., Tannich E.(2006). New insights into the phylogeny of *Entamoeba* species provided by analysis of four new small-subunit rRNA genes.Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56(Pt 9): 2235-2239 .

Molecular characterization of *Entamoeba spp.* In Al-Qadisiya province, Iraq

Dr. Hadi Madlul Hamza Al-Mayali

University of Al-Qadisiya

Faculty of Education

Dr. Hiba Riyadth Jameel Al-abodi

University of Al-Qadisiya

faculty of Science

ABSTRACT The current study involved the use of the DNA sequencer method to confirm the diagnosis of *E. histolytica*, *E. dispar* and *E. moskovskii* isolates, to register data globally in the Gen Bank and to identify any isolates in the world that are very similar to Iraqi isolates. Twenty samples of faeces were subjected to infected patients The results showed that 13 isolates (5 isolates of *E. histolytica* *E. dispar* and three isolates of *E. moskovskii*) were electrically stage on the gene of the gene of the 18S gene ribosomal RNA Which represent the diagnostic legacy of the three species The PCR product was then sent to Bioneer in South Korea for DNA sequence sequencing. The NCBI-Genbank-



Blast Alignment tool and the MEGA6 program were used to analyze the results of parasite isolation sequences and identify the tree Evolution of amoeba species under study and the detection of the sequencing of the nitrogen bases of the 18s r RNA gene in the studied samples Since there is no earlier studies in Iraq on the analysis of nitrogenous sequence *E. histolytica* *E. dispar* and *E. moskoviskii* Samples were subjected to molecular characterization in the NCBI database of the gene bank and serial numbers were obtained KP233836 KP233837 KP233838 KP233839 KP233840 for type *E. histolytica* and KP722596 KP722597 ,KP722598 and KP722599 and KP7225600 for type *E. dispar* and serial numbers KP7225601 KP7225602 KP7225603 for type *E. moskoviskii*.