وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية / كلية التربية

قسم علوم الحياة

التتابع الجيني لطفيليات *Entamoeba histolytica , E. dispar and E. moshkoviskii* في محافظة القادسية

اطروحة مقدمة

الى مجلس كلية التربية في جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة

في علوم الحياة علم الحيوان

من قبل

هبة رياض جميل العبودي

بكالوريوس علوم حياة - 2006

ماجستير علوم حياة - ٢٠٠٩

اشراف

الأستاذ الدكتور

هادي مدلول حمزة الميالي

صفر 1437 هـ

تشرين الثاني2015

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة للمدة من بداية اذار 2014 والى نهاية أيلول 2014 وشملت على مراجعين مستشفى الديوانية العام ومستشفى النسائية والأطفال في محافظة القادسية ومختبرات التحليل الأهلية في المحافظة ,وقد تم فحص 679 عينة براز باستخدام طريقة المسحة المباشرة لمختلف الفئات العمرية ولكلا الجنسين و أظهرت الدراسة وجود إصابة 61.26% بواقع (416) عينة موجبة من الأشخاص المفحوصين مصابين بطفيلي الأميبا .

تـــم في الدراسة الحالية استعمال تقنيـــة تفاعـــل البلمـــرة التسلسلي ذي الوقـــت الحقيقي (Real – Time PCR) لتشخيص أنواع الأميبا في (200) عينة من العينات موجبة الفحص المجهري , وقد أظهرت النتائج أن أعلى نسبة اصابة كانت للنوع *Entamoeba histolytica* يليه النوع *Entamoeba dispar* ثم النوع *Entamoeba moshkoviskii* وبنسبة ٧٤% و ٢٦% و ٧% على التوالي وقد بينت نتائج التحليل الاحصائي وجود الفروق المعنوية المهمة احصائيا تحت مستوى معنوية $p \leq 0.05$, ومن الجدير بالذكر ان نسبة العينات موجبة الفحص الجزيئي اعلى من نسبة العينات سالبة الفحص الجزيئي بنسبة ٨٨% و١٢% على التوالي.

قسمت دراسة الاصابات المفردة والمختلطة لأنواع الأميبا باستخدام التشخيص الجزيئي حيث كانت أعلى نسبة اصابة مفردة للنوع *E. histolytica* يليه النوع *E. disbar* ثم النوع *E. moshkoviskii* بنسب ٥٦% و ١٠% و ١% على التوالي وقد اشارت نتائج التحليل الاحصائي الى وجود الفروق المعنوية احصائيا تحت مستوى احتمالية $p \leq 0.05$, اما بالنسبة للاصابات المختلطة فقد سجلت اعلى نسبة للإصابة المختلطة للنوعين *E. dispar + E. histolytica* تليه الاصابة المختلطة للنوعين *E. histolytica + E. moshkoviskii* ثم الاصابة المختلطة للنوعين *E. dispar + E. moshkoviskii* وقد بلغت ١٤% ,٤% ,٢% على التوالي واشارت نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروقات معنوية مهمة احصائيا تحت مستوى معنوية $p \leq 0,05$.

شملت الدراسة ايضا على الاعراض المرضية المصاحبة للإصابات المفردة بأنواع جنس الأميبا الثلاث وتبين ان المرضى المصابين بـ *E. histolytica* كانوا يعانون من حالات اسهال حاد تراوح قوامه بين المخاطي والمائي , اما لونه فقد تباين بين اللون البني والبني المحمر وحالات الاسهال الدموي والم في البطن تراوح بين حالات مغص شديد الى خفيف مصحوب بارتفاع طفيف في درجات الحرارة وفقدان في الوزن, اما المرضى المصابين بإصابة مفردة بالنوع *E. dispar* فقد لوحظ انهم يعانون من حالات اسهال متكررة بلون اصفر شاحب الى بني وقوامه شبه مائي والم في البطن , في حين لوحظت

الاعراض المرضية المتمثلة بحالات اسهال متوسط ذو قوام مخاطي نوعا ما وتراوح لونه بين الاصفر والبني والم في البطن وفقدان وزن لدى الافراد الذين ثبت اصابتهم بإصابة مفردة بالنوع *E. moshkoviskii* .

تم عزل العينات المصابة اصابة مفردة لكل نوع من أنواع الاميبا مسبقا وفق تقنية التشخيص الجزيئي R.T.PCR.(Taqman probe) واستخدمت للتحري عن جينات عوامل الضراوة الثلاث الخاصة بالامراضية وهي Gal/Gal Nac Lectin , Cystiene Proteinase , Amebopore في كل نوع من انواع الاميبا باستخدام البادئات الخاصة بجينات عوامل الضراوة قيد الدراسة بتقنية R. T. PCR. (Syber green) وتبين ان النوع *E. histolytica* يمتلك العوامل Cysteine Protienase1 و Amebopore و Gal/Gal Nac Lectin بنسب ٨٦,٦% و ٨٠,٣٥% و 42.8% على التوالي وقد اشارت نتائج التحليل الاحصائي الى عدم وجود فروق إحصائية, أما النوع *E. dispar* فقد أظهرت النتائج وجود جينات عوامل الضراوة الثلاث ايضا، بنسب بلغت ٦٥% و٤٥% و ٢٠% على التوالي وقد اشارت نتائج التحليل الاحصائي الى وجود الفرق المعنوي بين نسب عزل الجينات لعوامل الضراوة الثلاث تحت مستوى معنوية $p \leq 0.05$, كما بينت النتائج وجود جين عوامل الضراوة الاول والثاني في النوع *E. moshkoviskii* بنسب بلغت لكلا العاملين ٣٣,٣ % في حين لم يسجل أي وجود لجين العامل Gal/Gal Nac Lectin وقد اشارت نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروق معنوية احصائيا بين نسب عزل جينات عوامل الضراوة قيد الدراسة في نوع *E. moshkoviskii* .

استهدفت الدراسة الحالية التوصيف الجزيئي التأكيدي لعزلات انواع الطفيلي الثلاث باستخدام تفاعل سلسلة انزيم البلمرة التقليدي Polymerase chain reaction كخطوة اولى للتحري عن مورثة 18s ribosomal RNA التي يمثل المورث التشخيصي للأنواع الثلاث من الاميبا قيد الدراسة وبالاعتماد على الجين ذاته تم تحليل الشجرة التطورية لأنواع الاميبا باستخدام طريقة (Neighbor – Joining) بين المجموعات المختلفة لسلالات كل نوع من انواع الاميبا الثلاث على حدة باستخدام برنامج (MEGA6) ولمعرفة نسب التقارب ما بين السلالات قيد الدراسة والعزلات العالمية في قاعدة البيانات data base من بنك الجينات العالمي NCBI باستخدام برنامج Blast ولعدم وجود دراسات سابقة في العراق حول تحليل تتابع القواعد النتروجينية لعزلات الانواع *E. histolytica* و *E. dispar* و *E. moshkoviskii* فقد تم تسجيل العينات التي خضعت للتوصيف الجزيئي التأكيدي تحت قاعدة البيانات في المركز الوطني للمعلومات NCBI الخاص ببنك الجينات العالمي و تم الحصول على الارقام التسلسلية عالميا لكل نوع منها ولأول مرة في العراق حيث ان العزلات العراقية للاميبا غير مسجلة عالميا.

استعراض المراجع

لقد حددت بعض الدراسات أعراض معينة لهذه الإصابة كما في دراسة (Gonin and Trudel 2003) عند دراستهم لعينات 96 مريضا في كندا مصابون بطفيلي *E.dispar* ظهرت عليهم أعراض مثل الإصابة في الإسهال المزمن لمدة تراوحت ثلاث أسابيع مع دم ضئيل وحمى ليوم واحد ومغص في البطن وغثيان في حين سجل (Pestehchian *et al*. (2011 أعراض الإسهال والحمى والتشنج في بعض أعضاء الجسم لدى المصابين بهذا الطفيلي في ايران، ويعتبر التميز بين *E. histolytica* و *E.dispar* مهم جداً وذلك لأن الإصابة بالنوع *E. dispar* لا تحتاج بالضرورة الى علاج (Araujo *et al*. , 2008) بينما الإصابة بالنوع *E. histolytica* تحتاج للعلاج لما يسببه من مرض الزحار الأميبي الذي قد يؤدي في حالة اهمال الحالة و تأخر العلاج الى موت المصاب، و يتفق ذلك مع ما أشار اليه (Pestehchian *et al*. (2011 بعدم وجود الحاجة الماسة للعلاج عند الاصابة بالنوع *E. dispar* في حالة ألتهاب القولون.

وينتشر هذا النوع في المناطق التي يقل فيها الاعتناء بقواعد تنظيم الصرف الصحي للمجاري(Pestehchian , 2011)

تحدث الإصابة للإنسان نتيجة تناول الخضروات الملوثة بالطور المتكيس للطفيلي أو شرب المياه الملوثة بها، اذ يتميز الطور المتغذي النوع *E. histolytica* بقدرته على هضم كريات الدم الحمراء مما ينتج عنه إسهال دموي (Gonzalez – Ruiz *et al*. , 1994) بينما النوع *E. dispar* قادر على هظم كريات الدم الحمر عند الزرع في الأوساط مختبرياً خارج الجسم وهي لا تتمكن من ذلك داخل الجسم في القولون وحتى في حالة وجود الدم في الإسهال عند الاصابة المفردة للنوع *E. dispar* فأن السبب يعود الى وجود أصابات ثانوية أخرى على سبيل المثال الإصابة بالشيغلا Shigillosis (Ackors , 2002) .

لقد بحثت العديد من الدراسات موضوع التميز بين *E. histolytica* و*E.dispar* كما في دراسة (Troll *et al*. (1997 التي استهدفت التحري عن النوعين والتميز بينهما بطريقة التركيز وتقنية PCR التقليدي ودراسة (Pillai *et al*. (1999 في كندا للتميز بين النوعين باستخدام تقنية ELISA ودراسة (Pinheiro *et al* (2004 باستخدام تقنية PCR التقليدي في البرازيل، ودراسة (Nesbitt *et al*. (2004 باستخدام تقنية PCR في تنزانيا , في حين استخدم Elsobky *et al*.

(2011) في مصر تقنية Multiplex PCR و (2011). Pestehchian *et al* في ايـــران تقـنية PCR التقلــيدي و ناصر (2010) في العـــراق في تكــريت ايضا باستخدام تقـــنية PCR التقـــليـــدي للتشخيص, هذا بالإضافة الى (Al-kahfaji,(2014 في محافظة الديوانية في العراق باستخدام تقنية single round PCR ، وغيرها من الدراسات التي أخذت على عاتقها التميز بين هذين النوعين باستخدام الطرائق الجزيئية.

3-1-2: النوع *E. moshkoviskii*

عرف هذا النوع في بداية ظهوره أنه حر المعيشة اذ سجل لأول مرة عام 1941 في Tshalaia (Clark and Diunond , 1991) ينتشر وجوده في بيئات مختلفة تراوحت بين رواسب الأنهار النظيفة الى سواحل البرك الضحلة (Clark and Diamond , 1997) كما ثبت وجودها في مياه المجاري في روسيا وانكلترا ووسط اسيا وشمال أمريكا والبرازيل و من ثم مرحلة ظـــهور الطفيلي في براز المرضى المصابين بالزحار الاميـــبي ولعلة وجود التشـابه الشكلي الكبـــير بين الطـــور المتغـذي والطور المتكيـــس لهذا الطفـــيلي مع النوع *E.histoyltica* لذا كان مـــن الصعب تشخيصه وبفـــــضل التطور الحاصل في طرائق التشخيص وظهور التقنـــيات الدقيقة وعالية الحســـاسية أصبح بالإمكان التحري عـن وجـــود الطـــفيلي في عيـــنات براز المصابيـن (Ali *et al* ., 2003 Parija *et al*) . ., 2010

سجلت العديد من الدراسات نسب أصابة أظهرت أن الانسان هـو المضيف الملائم والحقيقي لهذا الطفيلي ولـــيس المضيف العابر وقد سجل وجود هذا النوع في الأنسان في العديد من الدول أبتداءً من شمال أمريكا , ايطاليا , جنوب أفريقيا , بنغلادش ولم يذكر ان له علاقة الاضطرابات المرضية Clark) Haque *et al*., 1998; and Diamond, 1991b) ونظراً لان الدراسات السابقة لم تثبت حقيقة ان النوع*E. moshicoviskii* قادرة على أحداث المرض لذا يجب مراعاة الدقـــة في التشخيص بينها وبين الأنواع المشـــابهة وذلك لتجنـــب أخذ العـــلاج بالنســبة للأنواع غيـــر الممرضة (Ngui *et al.,* 2012).

ولغرض دقة الدراسات التشخيصية والوبائية توالت البحوث والدراسات مع تقدم طرائق التشخص اذ تم تسجيل ظهور النوع *E. moshicoviskii* لأول مرة في بنغلادش عام 1998 لدى الأطفال من قبل Haque *et al* . (1998) كما سجل وجوده في الأنسان في الهند أيضاً (Parija and Khairnar, 2005) وقد قام (2007) ., Fotedar *et al* بالدراسة الجزيئة الأولى من نوعها لتشخيص الأنواع الثلاث في سدني في أستراليا, وسجل أيضا وجوده في المصابين في تركيا (Tanyuksel *et al*., 2008

(, أما في العراق فقد قام ناصر (2010) بتسجيل النوع *E. moshkoviskii* بأستخدام تقنية PCR التقليدي في محافظة تكريت و جاءت بعده (Al-Kahfaji,(2014 في محافظة الديوانية باستخدام تقنية single round PCR .

اكـــدت بعض الدراسات ان النـــوع *E. moshkoviskii* غيـــرممـرض (Khairnar and Parija, 2007) الا ان هناك دراسات في نفس الوقت سجلت ظهور بعض الاعراض المرضية لدى المصابـــين بهذا الطفـــيلي مثل الاسهال والاضطرابات المعوية (Ngui *et al.*, 2012) في حين ان دراسة اجراها Fotedar *et al.*,(2007) ذكروا فيها ان القـــدرة الامراضية لهذا الطفـــيلي غير واضحة ولم يجـــزموا على انه غير ممرض، وبالتدقيـــق اكثر في نتـــائج البحوث والدراسات التي ركزت على هذا النوع فقد لوحـــظ في دراســـة اجراها Tanyuksel *et al.* (2007) تم خلالها فحص 100 عينة لأشخاص مصابين بطفيلي الاميبا لوحظ ان هناك حالتين من المصابين كانت بالنوع *E. moshkoviskii* الاولى كانت لطفلة بعمر سنتين والثانية كانت لامرأة بعمر ست وثلاثين عاماً، وفي كلتا الحالتين ظهرت اعراض الاسهال وفقدان الوزن و الاعياء كما كانت عينات البراز ذات لون اصفر شاحب وقد اشارت هذه الدراسة الى احتمالية ان يكون النوع *E. moshkoviskii* نوعا ممرضا واوصت الدراسة بأجراء دراسات اكثر دقة حول امراضية هذا الطفيلي، وفي دراسة اجريت في سدني في استراليا اعطت احتمال كبير حول قدرة هذا الطفيلي على احداث المرض اذ تم عزل الطفيلي من اشخاص مصابين باضطرابات معوية وحالات اسهال وألم في البطن ومن جانب اخر تم التحري عن نفس الطفيلي في عينات براز لأشخاص اصحاء وثبت عدم وجود الطفيلي مما يعطي احتمالية كون هذا الطفيلي ممرض وقد اشارت الدراسة الى الحاجة لبرهنة سبب الحالة المرضية والتي ترجع للطـــفيلي او وجود اصابات ثانـــوية اخرى.

كما بيـنت دراسة قـام بها الباحثون Shimokawa *et al.*, (2012) أن طفيلي *E. moshkoviski* له القدرة على ان يسبب الاسهال وفقدان الوزن و التهاب القولون عند اصابته للفئران ،كما وجد ان هـذا النوع قادر على تحليل كريات الدم الحمراء للـــجرذان كنموذج عـن الثدييات بينمـا كـانت كريات الـدم الحمراء للإنسان مقـاومة بشـدة للتحلل، كـما اشـــار بعـــض الدراسات الى ان هذا الطفيلي يعتبر عامل مسبب للمرض ويستـــخدم في تشخيص داء الاميـــبا نظرا لتواجـــده بكثرة في المناطـــق التي ينتشر فيها داء الاميبا مصاحـــبا لوجود طفيلي *E. histolytica* ومن الجدير بالذكر ان بعض الدراسات اشارت الى ظهـــور اضطرابات معـــوية ايضا في الحـــالات التي سجلت اصابات مختـــلطة مع طفيـــلي *E. dispar* و *E. histolytica* (Parija and Khairnar; 2005; Ali *et al.*,2003)

2-2 التصنيف : Classification

فيما يلي التصنيف العلمي الكامل للأنواع الثلاث (Litchford , 2000) :

Kingdom : Protista

Subkingdom : Protozoa

Phylum : Sarcomastigophra

Subphylum : Sarcodina

Superclass : Rhizopoda

Class : Lobosea

Order : Amoebida

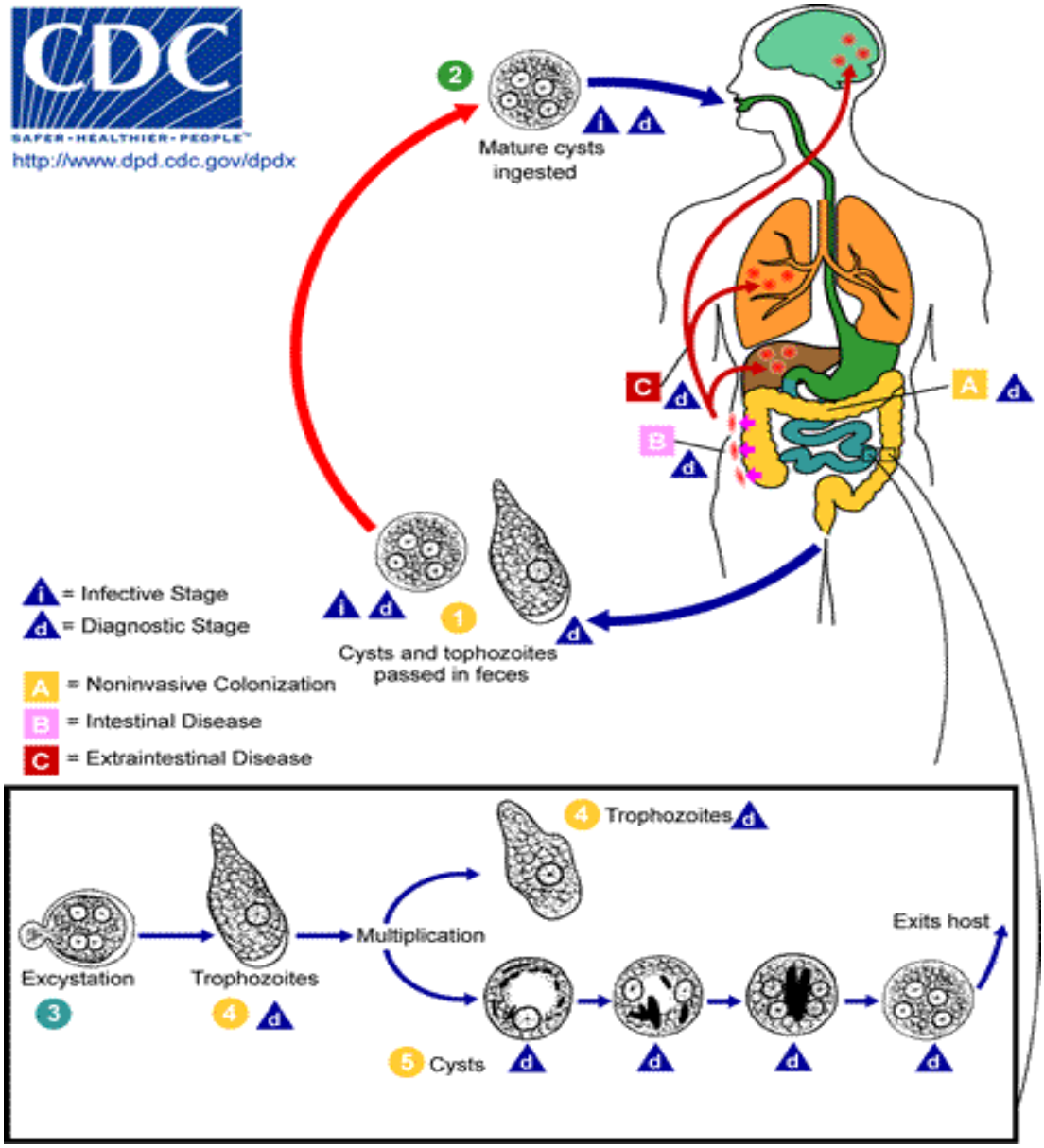
Family : Entamoebidae

Genus : *Entamoeba*

Species : *E.histolytica* , *E.dispar* , *E. moshkoviskii*

2- 3 الشكل ودورة الحياة : Morphology and Life Cycle

يمتلك طفيلي الاميبا اربع اشكال مميزة في دورة حياته هي طور الناشطة trophozoite وطور ما قبل الكيس precyst وطور الكيس cyst وما بعد الكيس metacyst (Geraled and larry, 2005) والشكل (2-1) يوضح رسم دورة حياة أنواع الأميبا



الشكل (3-2) دورة حياة أنواع الأميبا

(from : CDC , 2007)

2-4بعض العوامل المؤثرة على طفيلي الاميبا

تعد الطفيليات الابتدائية و الديدان المنتقلة بالتربة soil transmitted helminthus من المشاكل الرئيسة للصحة العامة (Savioli *et al.*, 1992) اذ تحدث الاصابة بداء الأميبات amoebiasis نتيجة الاصابة بالطفيلي *E. histolytica* فهو مسؤول عن حوالي 40.000 الى 100.000 حالة وفاة سنويا، لذلك يعتبر هذا المرض مشكلة صحية حقيقية خصوصا في البلدان النامية (Sebastiaan *et al.*, 2007) ويختلف انتشار داء الأميبيات بين الافراد كما يختلف بين البلدان وبين المناطق مع اختلاف الظروف الاقتصادية

والاجتماعية، وتصل نسبة انتشاره احيانا 50% من السكان في المناطق المتضررة التي تعاني من تردي الاوضاع الصحية، ويعتقد ان داء الأميبيات يؤثر تأثيرا مباشرا على اكثر من خمسين مليون شخص مما يتسبب في خسائرفي القوى البشرية فضلا عن الاضرار الاقتصادية الناتجة عنها (Tanyuksel and Petri, 2003) كما ان معدلات الاصابة تختلف بين الدول والبيئات والظروف الصحية والسكانية الموجودة في المنطقة (Al-Harthi and Jamjoom, 2007) .

كما هو معروف أكياس الأميبا الحالة للنسيج المسؤول الوحيد عن انتقال العدوى ، و في أغلب الحالات تنتج الإصابة في الأصل من الأفراد عديمي الأعراض الحاملين للطفيلي و الذين يمررون الأكياس عبر البراز خاصتهم اعتماداً على الظروف البيئية المحيطة اذ ان لهذه الأكياس القدرة على مقاومة التحميض acidification و الكلورة chlorination و التجفيف desiccation كما انها قادرة على البقاء على قيد الحياة في البيئات الرطبة و لعدة أسابيع عِدّة (Huston and Petri,1999) .

تستوطن انواع الاميبا بنسبة عالية في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية وخصوصا في المناطق الفقيرة اقتصاديا اذ ترتبط الاصابة بالمرض بالواقع السكاني والصحي (Norhayati *et al.*, 2003) ، كما ان مياه الفضلات وغائط الانسان المصاب والحيوان تستخدم كمخصبات او اسمدة لمختلف المحاصيل الزراعية في مساحات واسعة فهي تزيد انتاجية المحصول بنسبة 10-30 % وهذا الاستخدام شائع في الصين وجنوب شرق اسيا وكذلك مناطق مختلفة من قارة افريقيا وتختلف مصادر مياه السقي كما في فيتنام ، اذ تعتمد على المياه العذبة ومياه الفضلات والمياه الجوفية و هذا يبين ان المياه الملوثة هي جزء من مياه السقي وحوالي 85 % من المزارعين في فيتنام يستخدمون مياه الفضلات وغائط الانسان والحيوان في الزراعة وبسبب ذلك يقع الخطر المؤكد حول اكتساب العدوى بداء الاميبا عند السفر الى المناطق الاستوائية اذ يستوطن المرض هناك (Weinke and Friedrich-Janicke, 1990) كما يعزى الانتشار العالي للطفيلي في المناطق الاستوائية الى تدني مستويات الصرف الصحي مما يؤدي الى احتفاظ الاكياس بحيويتها وقدرتها على الاصابة كما تعتمد العدوى اعتمادا كبيرا على الغذاء الملوث والماء الملوث والتي يلعب الذباب المنزلي *Musca domestica* والصراصر Cockroaches دورا مهما في هذا الشكل من التلوث، اذ تعتبر نواقل ميكانيكية مهمة لأكياس الطفيلي من الغائط الطري الى الماء والغذاء المكشوف و ادوات الطعام، كما ان المضائف الخازنة الاخرى غير الانسان كالكلاب والخنازير والقرود يمكن ان يكون لها دور كبير في انتقال المرض (Geraled and Larry, 2005) ، اذ يعد تناول الماء أو الغذاء الملوثين ببراز يحتوي على أكياس الأميبا ، فضلاً عن التماس البرازي- الفموي fecal-oral contact بوساطة الأيدي الملوّثة هي الطرائق الرئيسة للإصابة ، كما ان انتقال الأميبا الحالة للنسيج عبر الماء شائع في دول العالم الثالث ، إذ ان معظم تجهيزات مياه الشرب غير معاملة, كما يعد استعمال فضلات الانسان بوصفها مخصباً للتربة هو الآخر مصدراً مهماً للإصابة (Markell *et al.* , 1992).

من الجدير بالذكر أن هناك علاقة بين مجاميع الدم ABO والاصابة بمرض الزحار الاميبي, اذ بينت دراسة حسين، (2009) بأن الاشخاص من صنف الدم O من الذكور و الاناث هم الاكثر تعرض للإصابة بمرض الزحار الاميبي وتليها بعد ذلك الاصناف (AB,B,A)، كما ذكر دراسة (Haque *et al.*(2003 بأن الاطفال في بنغلادش ذوي الصنف O و الصنف AB هم الاكثر عرضة للإصابة بمرض الزحار الاميبي من الاطفال ذوي صنف الدم A و B ، وان وجود علاقة بين مجاميع الدم A,B,O والاصابة بالأمراض الطفيلية قد يعود الى احد الجينات المسؤولة عن توارث مجاميع الدم التي ربما تساعد في زيـادة قابلـــية التصاق العوامل الممرضة ومن ثم احداث الامراضية.

5-2 التشخيص المختبري Laboratory Diagnosis

يتم الاعتماد في تشخيص طفيلي *E. histolytica* على الفحص المجهري لِشكل الطفيلي الأوّلي و بالأخص في حالة الاسهال الدموي خلال نصف ساعة الى ساعة من وصول العينات للمختبر؛ إذ يدل وجود الناشطات الأميبـــية الملتهـــِمة لكريّات الدم الحمر erythrophagocyte trophozoites في عيّـنات البراز على حـدوث إصابة بالأميـــبا الحـــالة للنســيج (Haque *et al*., 1995) ، و لقـــد اعتبـــر الفحص المجهري من قبل الباحثـــين نوعيـاً بنسبة 100% لتشخيص داء الأميبا (Gonzalez-Ruiz *et al*.(1994 وعلى الرغم من ذلك فإن حالات الاسهال الدموي قليلة نوعا ما، و في حالة غياب الاطوار الناشطة ملتهِمة كريّات الدم الحمر، تكون حساسية المجهر محدودة؛ و ذلك بسبب عدم القدرة على التمييز بين العيّنات المحتوية على الأميبا الحالة للنسيج و تلك المحتوية على الأميبا المتغيّرة الأكثر انتشاراً بأكثر من عشر مرات، كما ان حدوث حالات اشتـــباه بين الأميبا الحالة للنسيج و الأميبا الأخـــرى غيـر المرضية أو كريّات الدم البيض في العيّنات غالباً ما ينتج منه تشخـــيص خاطئ بداء الأميبا، وفي السنوات الأخيرة تطورت التقنيات الأحيائية الجزيئية Molecular Biological Technition لتكون أساسا في التشخيص والتحري عن الأميـــبا الحالة للنســـيج ، الا ان الكلفة العـــالية واستهلاك الوقت الذي تمـيزت بها هذه التقنـــيات هذا فضلاً عن قلة الخبـرة جعل الفحص المجهري هو الأختـــبار الوحيد المتبع في الدول الفقيـرة ، بينما انحصرت الاختبارات الأخـــرى الحـــديثة فـــي الدول المتـــطورة وفـــي المـــختبـــرات البحـثيـــة فقـــط (DiMiceli, 2004 ; Tanyuksel and William, 2003) ويتم التشخيص المختبري بعدة طرق هي :

2-5-1: طريقة الفحص المباشر Direct Examination

تتضمن هذه الطريقة ملاحظة البراز عيانيا والتعرف على طبيعته المظهرية التي ممكن أن توحي بالخمج بالأميبا الحالة للنسيج (Tanyuksel *et al.*, 2005) ، والذي يكون في حالة الخمج الحاد بـ *E. histolytica* دموياً ومخاطياً Bloody and Mucus إذ تشـــاهد في مثل هذه العينات الأطوار الناشطة فقط ، حيث يتم عمل مسحات من هذا البراز من مـــناطق مختـــلفة من العـــينة وفحصها تحت القوة الصغرى (10X) ثم القـــوة الكبرى (40X) وذلك بعـــد صبغها بصبغة اليود أو من دون صبغها (Gonzalez-Ruiz *et al.*, 1994)، أما البراز الصلب فيحوي فقط على الأطوار المتكيسة التي تتـــميز (الناضجة منها فقط) باحتوائها على أربع أنوية مع وجود الأجسام الكروماتيدية العصوية الشكل ذات النهايات المدورة ؛ وبذلك يمكن تمييزها من الطور المتكيس للـ *E. coli* غير الممرض حيث تكون الأجسام الكروماتينية ذات نهايات حادة (Markell *et al.*, 1999) ، و توجد عدة أصباغ بالإمكان استخدامها في هذه الطريقة وذلك لتساعد في تشخيص الأطوار المتكيسة والناشطة لطفيلي الزحار الأميبي، فمثلا تستخدم صبغة اللوكل أيودين Lugol's Iodine والذي يصبغ النواة بلون بني غامق والسايتوبلازم بلون أصفر أو بني فاتح ، وتستعمل صبغة Buffered blue wet mount لصبغ الطور الناشط والطور المتكيس ؛ وذلك لأن صبغة اللوكل أيودين تعمل على قتل الطور الناشط وكذلك تستعمل أصباغ أخرى لصبغ العينة مثل صبغة Iodin tricome وصبغة Iron haematoxylin (Ravdin, 2000) .

2-5-2 الطرائق الزرعية Culture methods

استخـدمت هذه الطريقة لعـزل أنواع الأمـــيبا منذ اكـــثر من ثمانـــين عام و تضمن الـوسط الزرعي مزرعة نقـــية axenic culture ومزرعة غيـــر نقية xenic culture اذ يمكـــن ان يتـــم زرع طـفـيلي *E. histolytica* من عينات الغـــائط ومن عينـــات الخزع المستـــقيمية او الخراجـــات الكبدية وتشير المصادر المختبرية الى ان نسبـــة نجاح زرع طـفـيلي *E. histolytica* تتراوح بين-70 50 % وهذه الطريقة غير روتينية و اقل حساسية من طريقة الفحص المجهري وتعد عملية صعبة ومكلفة وتحتاج لعمل متقن بالإضافة الى البكتريا والفطريات او الابتدائيات الاخرى التي تعتـبر مشـــكلة رئيسة تواجه الزرع لذلك فأن هـــذه الطـــريقة لا يوصى بها كـطريقة تشخـــيص روتينـــية معتـمدة من اجل كشـــف أنواع الأمـــيبا مختبريا (Clark and Dimond, 2002)، في حين توصل Sargeaunt *et al.* (197٨) الى ان تحليل مشابهـــات الانزيم Isoenzyme analysis يمكـنه ان

يمــيز بين انواع الاميبا اذ يميز بين *E. histolytica* و *E. dispar* وكان يعــتبر المقياس الذهبي لتشخيص الخمج الاميبي قبل تطور التقنيات الحديثة المعتمدة على DNA (Sehgal *et al*., 1995).

3-5-2 : الاختبارات المصلية Serological tests

يتــم من خــلالها الكــشف عن الأضــداد بعدة بطــرائق (Sodeman, 1996) منها :-

١- فحص التلازن الدموي غير المباشر Indirect hemagglutination antibody (IHA)
٢- الترحيل الكهربائي المناعي المتضاد Counter immunoelectrophorsis (CIE).
٣- فحص الامتصاصية المناعية المرتبطة بالانزيم Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA).
٤- فحص الانتشار المناعي Immuno diffusion (ID)
٥- فحص الانتشار الاميبي على الهلام Amoebic gel diffusion test(AGD).
٦- تثبيت المتمم Complement fixation (CF).
٧- الفحص الومضي المناعي غير المباشر Indirect immune-fluorescence assay (IFA).
٨- فحص تلازن لاتكس Latex agglutination.(LA)

جاء العمل بهذه الطرائق منذ فترة ليست بالقصيرة للتمييز بين أنواع جنس *Entamoeba* ويعد اختبار تقنية ELISA من اكثر الطرائق شيوعا في الاستخدام لتحديد الخمج بداء الأميبات خصوصا في المرضى المصابين بخراج الكبد الاميبي، ولهذه الطريقة القدرة على تحديد اجسام الضد في المصابين بنسبة عالية حيث يظهر الكلوبيولين المناعي IgG في الدم بعد مرور اسبوع واحد من الخمج بالتهاب القولون وخراج الكبد الاميبي، ومن الجدير بالذكر ان بعض من هذه الأختبارات يــكون متخصصاً في الكشــف عن عدة أنواع تعود لجنــس *Entamoeba* مثل *E. histolytica*، *E. dispar*، *E. moshkovskii*، في حين توجد اختبارات أخرى تكون متخصصة في الكشف عن *E. histolytica* فقط ، ويجب الاخذ بنظر الاعتبار ان هذه الاختبارات قد تعطي في بعض الاحيان نتائج كاذبة لأن وجود IgG لا يعد كمؤشر في المناطق التي يتوطن فيها المرض ولكن على وجه العموم فأن تحديد الخمج يعتمد على وجود IgG او على وجود IgM الذي يتكون خلال الاسبوع الاول من الخمج وإن الأهمية الأساسية لهذه الاختبارات هي قلة اعتمادها على التشخيص الذاتي كما هو الحال في الفحص المجهري (Gonin and Trudel, 2003)

4-5-2: الاختبارات الجزيئية : Molecular tests

من الأمثلة على هذه الاختبارات هو اختبار تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR) Polymerase Chian Reaction والذي يمتاز بقدرته العالية على تشخيص طفيلي الزحار الأميبي ؛ وذلك من خلال حامض DNA المستخلص من عينة البراز و تمتاز هذه الاختبارات بالحساسية العالية إذ إنها تستطيع تشخيص وجود طفيلي الزحار الأميبي حتى في حالة وجود طفيلي واحد في العينة ، كذلك فإن لها قابـــلية عالية على تفـريق الأنـــواع غير المرضية العـــائدة لجـنس *Entamoeba* عن *E. histolytica* . ومن العوائق التي تحول دون استخدام هذه الاختبارات بشكل واسع هي الكلفة الباهظة التي تتطلبها هذه الاختبارات فضلاً عن المستوى العالي من الخبرة الذي تحتاجه (Sebastiaan *et al.*, 2007)، وقد نجحت الطرائق المعتمدة على تقنية PCR في كشف الانواع الثلاث للأميبا وقد اختـــيرت للدراسات السريرية و الدراسات الوبائيـــة في البلدان المتقدمة (Calderaro *et al*., 2006)، و تطورت هذه التقنية الى عدد من الطرق واكثرها حداثة ودقة هي تقنية تفاعل سلسة انزيم البلمرة في الوقت الحقيقي Real time PCR وتقنية DNA Sequencer وفيما يلي تعريف بهذه التقنية الحديثة:

1-4-5-2 تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة في الوقت الحقيقي

Real time polymerase chain reaction (RT – PCR)

هو تقنية علمية حديثة تجمع بين تضخيم عينة الحامض النووي الوراثي وبين الكشف عن كمية ناتج التضخيم ونوعيتهِ في أنبوبة تفاعل واحدة الأمر الذي يحمي العينات من التلوث نتيجة فتح أنابيب التفاعل وإغلاقها (Bustin, 2002). وتعتمد هذه التقنية على كواشف النيوكليوتيدات ثنائية الصبغة Double dinucleotide Reagents التي هي عبارة عن صبغة مُشعَّة ترتبط مع كل كاشف له تسلسل مكمل لأحد الأشرطة الناتجة من التفاعل؛ اذ ترتبط صبغة مُصنِّعة للون Flourophore القادر على إطلاق الفلورسنت والمُسماة بالصبغة المراسلة Reporter بالطرف رقم (5) من الكاشف ويرتبط بالطرف رقم (3) من الكاشف صبغة أخرى تُسمى بالصبغة الماصة Quencher, وعند استثارة الصبغـــة المراسلة بالليزر أو الهالوجين تقوم هذه الصبغة بامتصاص طاقة الفوتونات ومن ثم نقلها إلى الصبغة الماصة عن طريق ميكانيكية تحويل الطاقة Fluoresce resonance energy transfer (FRET) (Shibli *et al*., 2008;).

وهناك تطبيقات كثيرة لإستعمال ألـ RT – PCR في المجالات الطبية مثلاً لتشخيص HIV (Human immunodeficiency virus) (Gibellini *et al*., 2004) وفي المختبرات لتشخيص الأمراض المستعصية كإنفلونزا الطيور والخنازير، ومن مزايا إختبار تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة في الوقت الحقيقي إنهُ لا يتأثر بالتضخم غير المتخصص, ويمكن مراقبة التضخم بالوقت الحقيقي من خلال

شاشة له مدى حركي واسع تصل إلى ١٠١٠ والتدوير فيه سريع جداً يتراوح من نصف ساعة إلى ساعتين بالإضافة إلى ذلك لا توجد معاملات ما بعد الإختبار كما في ألـ PCR.

٢-٤-٥-٢ طريقة DNA Sequencer

ويعرف بـ (تسلسل الحمض النووي) وهو عملية تحديد الترتيب الدقيق للنيوكليوتيدات داخل جزيء DNA، ويشمل أي وسيلة أو تقنية يتم استخدامها لتحديد الترتيب من أربع قواعد-الأدنين، الجوانين والسيتوزين والثايمين في شريطي الحامض النووي، وان ظهور أساليب تسلسل الحامض النووي السريعة قد تسارعت بشكل كبير في الأبحاث البيولوجية والطبية والاكتشافات العلمية (Hall,2004).

يمكن استخدام تسلسل الحمض النووي لتحديد تسلسل الجينات الفردية، و يوفر تسلسل ترتيب النيوكليوتيدات الفردية الموجودة في جزيئات DNA أو RNA المعزولة من الحيوانات والنباتات والبكتيريا أو تقريبا أي مصدر آخر للمعلومات الوراثية و هذه المعلومات مفيدة لمختلف مجالات البيولوجيا وغيرها من العلوم، والطب، والطب الشرعي، وغيرها من مجالات الدراسة (Morrison,2009)

وقد تطورت طريقة تقدير القواعد النيتروجينية منoligonucleotide الى طرق حديثة مثل capillary electrophoresis وذلك لتقدير القواعد النتروجينية في الحمض النووي DNA (Linder and Warnow,2005)

من الجـــدير بالذكر ان المسودة الأولية لتسلسل الجيـــنوم للنوع *E. Histolytica* قد أكتـــمل بشكل أولي وأستعمل في التجارب في المختبرات البحثية عام 2005 وبعـــد ذلك تم التعرف تسلسل الجيـــنوم للنوع *E. dispar* (وبمقارنة السلالتين وملاحظـــة درجة التشابه في التسلسل الجيني أطلق عليهما أسم الـــتوائم غير المتماثلة (Sterling and Adam, 2004 ; Clark and Daimond , 1997)،و تمت دراسة التسلسل الجيني للنوع *E . moshlcoviskii* وظهر بأنه ذو صلة وراثيـــة جيـــنية مباشـــرة قريبـــة جداً من السلالتيـــن المذكورتين (Clark and Daimon ., 1997) وتبـــلغ النسبة المئوية لتسلـــسل المتشـــابه في المناطق المشفـــرة من الجيـــنات حوالي 95 % اما في المناطق غير المشـــفرة فنســـبة التسلـــسل المتشـــابه بلغـــت 80 % بيـــن كل مـــن النوعين *E. histolytica* والنوع *E. dispar* وأن نسبة التغاير ضـــــمن النوع *E. moshkoviskii* يـــبدو أقـــل من 1 %

وهذا سمـــح بعمـــلية تصميم العـــديد من البادئات واستـــخدامها في الدراسات الجزيئية التشخـــيصية باستخدام تقنية PCR (Ghosh *et al* ., 2000).

6-2 الامراضية Pathogenicity

يعتبر الطفيلي الابتدائي *E. histolytica* هو المسبب الرئيس لداء الأميبا ويعتقد أن امراضيه داء الأميبا تحدث بعدة خطوات و بشكل عمليات متنوعة لذا فقد حاولت العديد من الدراسات أن تحل لغز آلية عوامل الضراوة والجزيئات والخلايا التي تعمل عليها والتي تؤدي بالنهاية الى احداث المرض، و أظهرت هذه الدراسات والبحوث المختبرية ان الامراضية عند حدوث داء الاميبا تتضمن المراحل التالية:

١- تفاعلات مع الفلورا الطبيعية.
٢- تحلل الخلية الهدف بواسطة الالتصاق المباشر.
٣- تحلل الخلية الهدف بواسطة السموم التي تتحرر من الطفيلي.
٤- التهام الخلية الهدف (Sehgal *et al*., 1996) وتعتمد التأثيرات المرضية للمتحولة الحالة للنسيج على شدة الإصابة وعلى مقاومة المضيف وحالة القناة الهضمية وطبيعة التغذية ،يعيش هذا الطفيلي على سطح الطبقة المخاطية وفي خبايا القولون و يعتمد نجاح حصول الخمج على عدة عوامل على حجم المستعمرة ,الحركة المعوية , وجود او عدم وجود الفلورا الطبيعية, غذاء المضيف و قابلـــية الامـيبا على الالتصاق بالخلايا الطلائية (Avila and calderon, 1993).

تكون اصابات اميبا الزحار في الأنسان اما غير مرضية في بعض الأفراد او مرضية في أفراد آخرين، الأنواع المرضية والتي تغزو الأنسجة يطلق عليها او تأخذ اسم المتحولة النسيجية والأنواع غير المرضية تسمى *E. dispar* ولايمكن التمييز بينهما مظهريا (Ackers, 2002) اذ ان الاخماج بطفيلي *E. histolytica* في الانسان غير متماثلة سواء تؤدي الى التعايش او حصول المرض فقد يتأثر بعدة عوامل منها سلالة *E. histolytica*, تفاعلات *E. histolytica* مع المجموعة البكتيرية والاستعداد الوراثي للمضيف، بالإضافة الى عوامل اخرى اهمها الجنس، العمر، مناعة الجسم، تغذية المضيف وغيرها (Gillespie and Richard, 2001)، وغالبا ما تكون الإصابات في المناطق المعتدلة غير مرضية ولذلك فقد سجلت نسب قليلة للإصابة في هذه المناطق من العالم وهذه الحالة مهمة من الناحية الصحية لأن معظم المصابين يكونون حاملين للمرض من دون أي أعراض سريرية (Miller , 1978) وهذا عكس ما يحدث في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية اذ تكون معظـــم الاصابات في هـــذه المناطق مرضية والطفـــيلي مستوطن فيها (Walsh, 1986).

إن الأعراض المرضية الناتجة من إصابة الإنسان بطفيلي الزحار الأميبي تقسم إلى اعراض معوية intestinal ونسيجية خارج الأمعاء extra-intestinal وهذا يعتمد على موقع الطفيلي من المضيف و حدوث الغزو النسيجي (Zeibig, 1997). تؤدي إصابة الأمعاء الغليظة بالأميبا إلى حالة مرضية تشمل اما الإصابة الحادة acute amoebiasis او الإصابة المزمنة chronic amoebiasis، ففي الزحار الأميبي الحاد تكون مدة الحضانة حوالي (10) أيام وتستمر إلى ثلاثة أشهر Arcari *et al*., 2000) .

بعد إستقرار الطفيلي في الأمعاء الغليظة وتكوينه التقرحات ulcers في الغشاء المخاطي تبدأ الأعراض المرضية للزحار الحاد بالظهور وتتراوح ما بين إسهال خفيف غير مصحوب بحمى إلى إسهال حاد يؤدي إلى الموت أحياناً و في البداية يكون شكل الغائط ليناً أو سائلاً وبعد ذلك تشتد الأعراض ويكون الغائط مصحوبا بمادة دموية أو يحتوي على القيح الذي يميل لونه إلى الإحمرار نتيجة لإختلاطه مع الدم و غالبا ما تصاحبه إصابة ثانوية بالبكتريا (Ravdin, 2004) ويشعر المصاب بصعوبة التغوط وبألم شامل في منطقة البطن و قليلا ما ترتفع درجة حرارة الجسم وهذا ما يميزه عن الزحار البكتيري الذي يكون دائماً مصحوباً بارتفاع درجة الحرارة، أما الإصابة المزمنة للأمعاء فتحدث غالباً بعد الإصابة بالزحار الأميبي الحاد وأحياناً بدون الإصابة ومن أعراضه التغوط غير المنتظم والإمساك constipation الذي تتخلله فترات من الإسهال تتراوح بين ٢ - 4 مرات ويشعر المصاب بآلام قليلة في البطن وظهور القيح مع الغائط مصحوبا بالدم كما يمكن ملاحظة الطور الناشط او اكياس الطفيلي عند الفحص المجهري لغائط المصاب (Ravdin, 2004 ; Tanyuksel and William, 2003) ، وتعد الأمعاء الغليظة والمنطقة المتعرجة منها المواقع الرئيسة للإصابة وبسبب بطىء حركة القولون مما يعطي فرصة بمهاجمة الطبقة المخاطية للأمعاء وهناك مواقع أخرى للإصابة كالقولون الصاعد والتعرجية السينية sigmoid flexure والمستقيم rectum والزائدة الدودية appendix (الحديثي وعواد ، 2000) .

يقوم الطور الناشط بمهاجمة الأنسجة بواسطة انزيماته المحللة اذ تبدأ الإصابة في نخر مساحة صغيرة من الطبقة السطحية للغشاء المخاطي مسببة قرحة كأسية الشكل flask - shape أو دورقية يبلغ حجمها بحجم رأس الدبوس ، يحتوي قعر القرحة على الأطوار المتغذية وعلى خلايا متحللة ومخاط ويمتد التقرح في الإصابات المزمنة على الطبقات العميقة كالطبقة تحت المخاطية submucosa (Murray , 2003; Rubin and Farber , 1999) , وكلما توسعت القرحة يكون هناك تجمع لأنواع من الخلايا وهي العدلات والخلايا اللمفية والبلاعم الكبيرة والخلايا البلازمية وأحيانا الحمضات (Rubin and Farber , 1999) . وقد يسبب التهاب الأمعاء حدوث الأشكال الثلاثة الاتية الذكر لداء الأميبات

المعوي السريري الحاد والتي تكون شائعة الحدوث بنسبة أكثر من البالغين موازنة بالأطفال ، وهي التهاب القولون الأميبي amoebic colitis وورم حبيبي أميبي ameboma grannuloma غالباً ما يلاحظ في منطقة الأعور والمنطقة السينية والمستقيم ، والتهاب الزائدة الدودية inflammed appendix، ويتميز التهاب القولون الأميبي بكثرة التبرز والآلام البطنية العامة وتشمل اعراض الحمى والإعياء السريع المتوالي وفي الآفات الشديدة كثيراً ما يحدث النزف المعوي أو ثقب الأمعاء ، ويكون العلاج النوعي المضاد لداء الأميبات غير فعال ويحتاج الأمر إلى تدخل جراحي .

أما الأورام الأميبية فهي آفات متورمة نوعا ما تحدث غالباً في مناطق القولون والأعور والمستقيم مصحوبة بآلام بطنية وإسهال دموي وتشبه الأعراض السريرية لالتهاب الزائدة الأميبي وأعراض التهاب الزائدة الجرثومي وكثيرا ما يصاحب ذلك الإسهال وجود دم في البراز وهما يعدان علامة مميزة، وتسبب أميبا الزحار أضـرارا أخرى في الأمعاء كتجلط الأوعية الدموية الشـعرية وتكون بقع نازفة في الأمعاء وارتشـاح الخلايا infiltration cells ونخر وعلامات الإلتهاب الأخـرى إضافـة إلى الإستـسقاء odema وفـرط التنـسج hyperplaslia والتـي تظـهر عندما تكـون هناك إصـابة ثانـوية بالبـكتـريا كمـا تنتـشر كريات الدم الحمراء بكثرة نتيـجة تحـطم الأوعية الدمـوية الصغـيرة ويمـكن إيجـاد الطفـيلي في قـعر القـرحة وخاصـة قواعـد الغـدد المعويـة او الأنسـجة Roberts andتنتشر الإصابة من موقعها الأولي في الأمعاء إلى الكبد بطريقـتين اما عـن طـريق مجـرى الدم الوريد البـابي الكـبدي hepatic portal vein) ، او بواسطة الإمتـداد المبـاشر للمرض مسبـبة التهاب الكـبد الأميبي amoebic hepatitis والمؤدي إلى خـراج الكبد liver abscess والذي يبدو بشكل كـتلة صغيرة من خلايا الكبد المتحورة التي تحتوي على سائل لزج محمر شاحب ناتج عن تحلل خلايـا الكبد وكريـات الدم الحمـر وعصـارة الصـفراء وشحـوم وغـيرها وبتقدم الحالة يصـاب المريض بالـهزال المصحوب بالشـحوب كما أن الفحـص المجهري يظـهر أرتـفاع عدد الكـريات الدمـوية البيضـاء إلى ما يقـارب 20,000 خلـية /سم^{3} او أكـثر (الحديثي و عواد، ٢٠٠٠) .

تنتقل الأميبا بواسطة الوريد الأجوف vena cava الأسفل إلى القلب ثم الرئتين مسببة داء المتحولات الرئوي pulmonary amoebiasis ثم خراج الرئة lung abscess حيث يتميز بقشعريرة و حمى وتعرق ، وقشع غزير ، وأحياناً قد تصل الدماغ مسبباً خراج الدماغ brain abscess الذي يعد من الحالات النادرة (Murray , 2003)، ويكون داء الأميبا الجلدي cutaneous amoebiasis عادة على هيئة إصابة ثانوية وتظهر الآفة على شكل مساحة جلدية ملتهبة ومرتفعة ذات حافات حمراء صلبة غير منتظمة وتوجد الأميبات في حافات هذه التقرحات وهـو مـرض غـير شائـع لـكـنه يـحـدث

فــي بعــض مناطــق العــالــم ويقسم داء الأميــبا الجلدي إلى ثلاثة مجاميــع، نسبة إلى مصاحبــته للآفات المعــوية الرئيسة وهي ما يحدث في النواسير المخرجية و ما يحدث في الجلد المحيط بالمخرج بعد التهاب القولون و الذي يكون ناشئاً من انتشار الطفيلي مع الدم ، ولا تعـــــتبر بعض المصادر الاميبا الجلدية مرضا بل تعبير عن المرض لارتباطه الوثيق بأميبا القولون والاعضاء الاخرى مثل الكبد والرئتــين والجــهاز التناســلي (Magana *et al*., 2004).

تكون معــظم اخمــاج *E. histolytica* خالية من الاعراض المرضية او قليلة التــأثير بسبب بقاء الاطــوار الناشـــطة في تجويف الامعاء وعدم مهاجمتها للأنسجة ويطــلق على الخمج في هــذه الحالة بالخمج غير المهاجم non-invasive infection وتخرج الاكيـاس في هذه الحالة مع البراز دون اعراض ويعد هؤلاء الافراد عاملا مهما في وبائية المرض (Gillespie and Richard, 2001).

7-2 عوامل الضراوة Virulence Factors

وهي العوامل الرئيــسية الموجودة في جميع انواع الاميبا الممرضة التي لها القدرة على التهام البكتريا و اتلاف الخلايا وتقود بالتالي الى اتلاف الانسجة وتحطيمها مما قد يؤدي الى الموت (Serrano-Luna *et al* ., 2013) ، وهناك العديد من عوامل الضراوة التي اشارت اليها الدراسات والبحوث وعن مسؤوليتها في غزو الانسجة ومن اهم هذه العوامل :

1-7-2 Cystiene proteinase السستين بروتينيز

عبارة عن سلسلة متعددة الببتيد تتألف من 447 حامض اميني، تتواجد في حويصلات سايتو بلازمية وفي الغشاء البلازمي للطور الناشط (Que *et al*., 2003) وهو احد الانزيمات المحللة للبروتين ويعرف على الاقل 20 جيـــن يشفــر هـــذا الانـــزيـم مــوجــودة لـــدى طـــفيلي الاميبا الحالة (Bruchhaus *et al*., 2003)، وقد اشارت مصادر اخرى ان التحليل الجيني للطفيلي يشير ان عدد الجينات المشفرة هي 50 جين وعلى الرغم من ذلك فأن هناك خمس جينات فقط ثبت وجودها في طفيلي الاميبا الحالة في الطور الناشط وهي,Ehcp12,Ehcp5,Ehcp3,Ehcp2,Ehcp1

(Rostamighalehjaghi *et al*., 2010; Tillack *et al*., 2007) ويؤلف السستين بروتينيز cp1, cp2, cp5 90% تقريبا من نسبة الانزيمات الخمسة الموجود (Stanley, 2003 ; Melendez-Lopez, 2007)، ويعتبر cp1 و cp2 من اهم عوامــل الضراوة الرئيسية لـــطفــيلي الاميـبـــا الحـالـــة للـنـســيـج الـــمعوي ومهم جـــدا في عملـية غزو الانسجة (Al-Torfi ,2014) ويلعب هذا الانزيم دورا رئيسيا في امراضية الطفيلي بسبب قدرته على تحليل

المواد الليفية والصفائحية والمطاطية والكولاجينية مما يؤدي بالتالي الى اختراق انسجة المضيف مسببا داء الاميبات المعوي (Sehgal *et al.*, 1996)

يعد الستين بروتينيز عامل الضراوة الاهم لحدوث المرض (Moncada *et al.*, 2003) وبالاضافة الى الدور المحلل الذي يقوم به هذا الانزيم فهو يمتلك القدرة على تحطيم دفاعات المضيف ابتداءا بالنسيج الطلائي الذي يغطي الامعاء وصولا الى الاجسام المضادة IgG و IgA (Tran *et al.*, 1998 ; Sehgal *et al.*, 1996)وبذلك يقوم هذا الانزيم بحماية الطفيلي من تأثير المتمم وتأثير IgG , IgA (Tran et al., 1998; Reed *et al.*, 1995) وبشكل عام تكون انزيمات cysteine protenase موجودة بشكل نشط و فعال في طفيلي *E. histolytica* اما طفيلي *E. dispar* فيبدو هذا الطفيلي فاقد لجينات معينة تشفر هذا الانزيم او ان الجينات تحوي العديد من الطفرات وليس لها القدرة على امكانية التشفير لهذا الانزيم، او ان فعالية هذا الانزيم الموجود مختزلة بالمقارنة مع الموجودة بطفيلي الاميبا الحالة (Jacobs *et al.*, 1998 ; Ryan and Ray, 2004).

2-7-2 Galactose N-acetyl- D-galactosamine اللكتين

هو عامل الالتصاق السطحي ويوجد في الاطوار المتغذية للطفيلي، كما ان له دور في عملية تحفيز التحلل الخلوي وايقاف ترسيب معقد Membrane attack complex of complemant (MAC) ، وقد يساهم هذا العامل في عملية استقرار الاميبا على طبقة protoglycan خلال عملية الغزو،وتتمثل ألية عمله كعامل التصاق سطحي رئيسي من خلال النهايات الحرة المكشوفة لجذور Gal/Gal Nac lectin التي ترتبط مع glycoprotien الموجود في سطح خلايا الهدف ويعتقد ان الطبقة المخاطية لقولون الانسان هي المستقبل الاول الذي يلتقي باللكتين لدى الطفيلي كما يعتقد انها تقوم بدور مناقض اذ تحمي المضيف من السم الخلوي للطفيلي بسبب ارتباطه بها في موقع الارتباط باللكتين وتعمل في نفس الوقت كموقع لاتصال الطفيلي لحدوث الاستقرار و غزو الامعاء الغليظة اي انها سلاح ذو حدين (Gillesqie and Richard, 2001)

يعتبر هذا العامل هو العامل المحدد لمعيشة الطفيلي بشكل مستعمرة من خلال التصاق الطفيلي بخلايا المضيف اذ يعد من عوامل الضراوة المتوفرة على سطح الطفيلي في الطور المتغذي (Petri *et al.*, 2006) اذ ان هذا الالتصاق باعث على استمرارية تحطيم النسيج من قبل الطفيلي نتيجة لأفرازات الاميبا مثل amebopore الذي يصرح بتدفق هائل لأيونات الكالسيوم خارج الخلية وهذا يرتبط مع تحرر البروتييز الى موقع الارتباط يتبعه انحلال للمادة الاساس (Petri *et al.*, 2002; Mccoy *et al.*, 1994) وعندما تهضم الخلية الهدف يبدأ بعد ذلك عمل

الالتهام الخلوي (Leippe *et al*., 1991 ; Long *et al*., 1985)، و بعد حدوث المستعمرة يعمل الطفيلي على اذابة وتحطيم الغشاء المخاطي ليكسب مدخل داخل الخلايا الطلائية وهذه الظاهرة ربما تنتج عن فعالية منسقة من طاقة cysteine protenase التي تتـحرر من الطفيلي (Knee *et al*., 1986).

3-7-2 Amebopore الثقوب الاميبية

يعرف بأنه بروتـــين له القدرة على تكوين قنوات ايونية او ثقوب في الاغشية الدهنية وخلايا الهدف الغير مستقـــطبة (Sehgal *et al*., 1996) وبعد دراسة هذا البروتين على نطاق واسع وجد انه على ثلاثة اشكال (A,B,C) بمعدلات (1 : 9 : 21) (Kayser *et al*., 2005; Bracha *et al*., 2002;Leippe *et al*., 1991) وتتواجد الانواع الثلاث من هذا البروتين في النوع *E. histolytica* في حين يمتلك *E. dispar* كميات صغيرة جدا من النوعين B, A ولا يمتلك النوع C مطلقا (Kayser *et al*., 2005) ، يتركب هذا البروتين من 77 حامض اميني تعمل على تحطيم البكتريا المهضومة واستعمالها كغذاء للأميبا وهذه الببتيدات تكون متمركزة في مكونات الفجوات الغذائية وتزداد فعاليتها في المحيط الحامضي (Haque *et al*., 2003) اذ يظهـــر فـــي الاميبـــا الحـــالـــة بهـــيئـــة مجـــسـات داخـــل حبيبيـــات فـــي الـــفجـــوات فـــي الطـــور الـــمتغذي (Brach *et al*., 2002) ، وهناك فرضية لعمل هذا الانزيم تعتمد على قدرة الطور المتغذي للأميبا الحالة على الالتصاق بالخلية الهدف بفعل مادة lactin فتدخل جزيئة amebopore الى الغشاء بدون الاعتماد على تفاعل مع مستقبل على غشاء الخلية، لكن احدى مشاكل هذه النظرية انه لايوجد احتمال لبرهنتها (Brach *et al*., 2002) ،وهناك شبه بسيط لوحظ بعمل هذا البروتين كعامل ضراوة مع ميكانيكة عمل عوامل ضراوة مهمة اخرى مثل CP5 (Ankri *et al*., 1998)

بالإضافة الى هـذه العوامل فمن الجـدير بالذكر ان الأنزيمات المحـللة للبروتينات موجودة في الضروب الممرضة وغير الممرضة للطـفيلي التي وجد ان قابلـيتها التـحليـلية مرتبـطة مع مكـونات الجـدار البلازمي (Munoz *et al*., 1982; Gadasi and Kessler, 1983). وعلى سبيل المثال فقد نقيّ انزيم B-N-acetylglucos aminidase من طافي مزرعة ضربين من ضروب الطفيلي ، ووجـــد أن هذا الأنزيم يلعب دوراً في تحطيم كريات الدم الحمر الملتهمة ، كما ان له دور في انفتاح (disruption) أواصر glycoprotein بين خلايا الطبقة الطلائية للأمعاء (Lundblad *et al*., 1986) ، وكما ذكر Munoz *et al*. (1982) في دراسته أن أنزيم Collagenase يلعب دور كبير في تحلل الكولاجين في موقع التلامس ، كما وصف Long-Krag

et al. (1985) أنزيمين تابعين للـ Phospholipase A enzymes في الطفيلي ، وذكروا أنها تلعب دوراً في التحلل الخلوي الاميبي , ولا يمكن ان نتجاهل إن إفراز الأميبا للسّم الخلوي (Cytotoxin) أو الذيفان المعوي (Enterotoxin) يسهم في أحداث الامراضية ضد الأنسان (Pittman *et al.*, 1973) .

لقد أشارت الدراسات في الأنسان والحيونات الى أن إمراضيه الطفيلي تعود الى تحطم الطبقة المخاطية للقـــولون في موقع الالتصاق(Takeuchi and Philips, 1975) أول من عرف الذيفان المعوي والسم الخلوي للأميبا هو(Lushbaugh *et al.*(1979 عندما طحن خلايا الطور الناشط للطفيلي وحقنها في عروة اللفائفي (Ileal loops) لدراسة فعالية الذيفان المعوي في هذه المنطقة ، ولاحظ أنه لا يوجد لها تأثير مميت في الخلايا المستهدفة (Target cell) . كما وجد Bos *et al.* (1980) أن المصل يحفز خلايا الطفيلي على أفراز سموم خلوية لها القابلية على قتل خلايا كلية الهامستر . كما وجد أن لفائفي الأرنب وقولون الجرذ المصابة بالطفيلي تحوي على ذيفان معوي (Udezulu *et al.*, 1982)ومن الجدير بالذكر أن التأثير المـميت للطـفيلي يحدث فقط في حالة حدوث تماس المباشر مع الخلايا المسـتهدفة (Bracha and Mirelmen ,1984).

أشارت الدراسات الى أن الليفات الدقيقة (Microfilamint) الأميبية التي توجد في الطور الناشط للطفيلي ضرورية لكي يتمكن الطفيلي من تحليل الخلايا المستهدفة (Ravdin *et al.*, 1985; Meza *et al.*, 1983) كما يلعب اللايزوسوم (Lysozyme) دورا مهما في تحرير مـــواد مميتة للخلايا المستهدفة ومصدراً للـ Phospholipase A (Long-Krug *et al.*, 1985). وأشارت دراسات أخرى الى أن الأميبا قادرة على تحليل الخلايا الالتهابية للمضيف مثل PMNs (Polymorphonuclear leukocytes) ، وأن سبب التحلل قد يعود لتحرير خلايا PMNs أنزيمات تسبب زيادة الســمية على أنسجة المضيف وبـــدون أن تؤثـــر في حيـــوية الطفـيلي (Ravdin *et al.*, 1985; Salata *et al.*, 1985) كما بيّن عدد من الباحثين أن الـ PMNs تشكل الاستجابة الأولية للمضيف ضد الإصابة بالطفيلي إذ إن هذه الخلايا وعند تماسها مع الطفيلي تموت وتتحلل ثم يتبع ذلك التحلل تنخر (Ncrosis) في الكبد والأمعاء ، ومن المحتمل أن يعود ذلك الى أن خلايا الـ PMNs تحرر ســـــموم تـــؤدي الى ذلك التنخر ، و الملاحـــظة نفسها شوهـــدت في كـــبد وأمعاء حيـوان الـجربوع Gerbils .

إن التصاق الطفيلي بالخلايا له أهمية امراضية ، وقد لوحظ أن التصاق الأميبا على الخلايا الطلائية للقولون تسبق عملية الاختراق اذ تلتـــصق على خلايا المضيف الالتهابية في الجسم الحي سواء على خلايا الـــقولون او في حالة خرّاج الكـــبد الأميـــبي وأستطاع كل من Kobiler and Mierlman

(1981) من عزل جزيئات سطحية من خلايا الطور الناشط ووجد أنها تسهم في التصاق الخلايا على طلائية الأمعاء ، اذ تم عـزل نوعين من مادة الـلكتين Lectin من سائـــل الطفيلي ، فيما تمكـن أخرون من عـزل مواد مثبطة لعمل الـلكتين Lectin وهي : Gal NAC ، و Gc NAC ، و Galactose residue Polymers (Bracha and Mirelman, 1984) كما أن الـكاربوهيدرات المرتبطة بالبروتين Carbohydrat-binding proteins الأميـــبي يلـعب دوراً في امـراضية الطفيـلي وفـي عمـلـية الالتصاق (Salata *et al.*, 1985) . ولأنزيم الـهستولايسين hystolysin دور مهم فـــي التـصاق الطـفيلي على الخلايا ، وكذلك في عـملية اختراق الأنسجة (Keene *et al.*, 1986) ، كما إن التصاق الطفيلي على خلايا المضيف الطـلائية أو خلايا الكبد مهمة في امراضيته إذ إن قتل خلايا هذه الانسجة تعتمد على عملية الالتصاق التي يتوسطها الـلكتين التي تؤدي فيما بعد الى تحلل هذه الخلايا (Soong *et al.*, 1995) .

8-2 الوبائية Epidemiology

1-8-2 الوبائية في العالم :

تنتشر الأميبا الحالـــة للـنسيـج وباقي انواع الاميبا في أنحاء العالم بصورة واسعة الا ان اعلى نسب للانتـشار سُجّـلت في الدول النامية و مناطـق شبه القارة الهندية و أجزاء من وسـط وجـنوب امـــريكا ، و الـــمناطـــق الاســـتوائـية فـــي افـــريـقيا وتمثل الإصابة بداء الاميبات واحدا من أهم أسباب الوفاة الناتجة عن الأمراض الطفيلية المعوية ، كما أن الخمج بـ *E. histolytica* يظهر باستمرار بين فقراء الدول النامية ويؤدي الى أصابة حتى المقيم في هذه الدول لكونه وباء يرتبط بتلوث الماء المحلي (Barwick *et al.*, 2002)، كما يؤثر داء الأميبات تأثيرا مباشرا على اكثر من خمسين مليون شخص مما يسبب خسائر في القوى البشرية والاضرار الاقتصادية (Tanyuksel and Petri, 2003)، ويقدّر عدد الإصابات بداء الأمـــيبا في العالم بحوالي 40 - 50 ملـيون إصـــابة تحدث سنوياً في العالم ، وينـتج منها 100.000 حالة وفاة (Walsh , 1986). هذه المعدلات العالية للوفيات تعود الى عوامل عِدّة أهمها : الجهل والفقر والازدحام الشديد وتجهيزات المياه الملوثة والصيانة المنخفضة للصحة العامة فهذه العوامل تسهّل انتقال العدوى من شخص لآخر، اما في البلدان الصناعية فتشير الدراسات الى ان داء الأميبا ينتشر في مجاميع معينة مثل المغتربين والسّياح المسافرين الى مناطق متوطنة بالمرض والأفراد الشواذ جنسياً و المصابين بفيروس نقص المناعة HIV فضلاً عن المرضى في المؤسسات العقلية (Tanyuksel & Petri , 2003) .

وفي المكسيك في أحد المسوحات المصلية ، ظهر ان 8.4 % من السكان مصابين بداء الأميبا و هذه النسبة تمثل مليون حالة إصابة (Caballero-Salcedo *et al.* , 1994), و في سويسرا فقد سجل (Troll *et al.* (1997 نسبة خمج بطفيلي *E. histolytica* وصلت الى 5.4% و *E.dispar* بنسبة 62.1% ، اما في المجتمعات المدنية شمالي شرقي البرازيل وُجد ان 10.6% من المتطوعين في دراسة وبائية كانوا مصابين بالأميبا الحالة للنسيج (Braga *et al.* , 1998) . ،وفي شمال الباكستان فقد كانت نسبة الإصابة بالأميبا الحالة للنسيج في الاطفال دون سن الخامسة عشرة هي 27% (Waqar *et al.* , 2003) ويتراوح انتشار الأميبا الحالة للنسيج بين الأفراد الأصحاء في ايران من 1-30% (Razaian , 2000) وفي تركيا فقد سجل (Tanyksel *et al.* (2007 نسبة خمج بطفيلي *E. moshkoviskii* بلغت 0.02% وفي Leon,Nicaragua ، سجل (Torres (2009 نسبة خمج بلغت 12% و24% بطفيلي *E.dispar* / *E.histolytica* عند فحص 480 عينة غائط مجهرياً من أشخاص أصحاء ، و134عينة غائط من مرضى مخمجين بالإسهال على التوالي ، وعند استخدام تقنية PCR سجل نسبة خمج 59% بطفيلي *E.dispar* و5% بطفيلي *E.histolytica* بين الأشخاص الأصحاء ، ونسبة خمج 7.5% بطفيلي *E.dispar* و 1.5% *E.histolytica* بين المخمجين بالأسهال .

سجل (Davane. *et al* (2012 في كولومبيا في دراستهم لانتشار الطفيليات المعوية في أحدى المستشفيات خلال فحص 2011 عينة بنسبة اصابة بالنوع *E.histolytica* *بلغت* (66.6) % ،كما سجل (Salcedo-cifuentes *et al.*(2012 انتشار الطفيليات المعوية بفحص 57 عينة للأطفال في سن (5-14) سنة في مقاطعة كالي وكانت نسبة انتشار النوع 4% للنوعين *E.histolytica* / *E.dispar* ، كم , وسجل(Gelaw *et al* . (2013 في شمال شرق أثيوبيا نسبة الإصابة النوع Entamoeba بين طلبة الجامعة بنسبة بلغت 9.2% أي بواقع 28 عينة من أصل 104 عينة للمصابين باضطرابات معوية.

2-8-2 الوبائية في البلدان العربية :

في بعض الدول العربية كالسعودية جرت دراسة للتعرف على مسببات الإسهال الحاد لدى الأطفال دون الخامسة من العمر في مدينة جدة ، اذ اظهرت ان الخمج بـ *Entamoeba histolytica* كان بنسبة 2.2% (El-Sheikh and El-Assouli, 2001) .و في القاهرة في مصر ، وجد ان 38% من الافراد المصابين بالاسهال الحاد المراجعين لإحدى العيادات الخارجية هم مصابين بالزُحار الأميبي (Abd-Alla and Ravdin , 2002) . وكذلك في دراسة اجريت في صنعاء باليمن وجد ان 11.7% من الاطفال المراجعين لمستشفى الاطفال المركزي مصابون بالأميبا الحالة للنسيج (Azazy & Raja'a , 2003)،و كانت نسبة الإصابة بالأميبا الحالة للنسيج في الاطفال بعمر 6-11 سنة في مدينة خان

يونـــــس بفلسطين هي 7% (El-Astal , 2005)، وفي تونـس سجـل Ayed *et al*. (2008) نسبة خمج مفرد بلـغت 81.4% بطـفيلي *E.dispar* وسجل خمج مخـــتلط بلغت 7.4% بطفـيلي *E. moshkovskii* و*E.dispar* ولم يسجل الخمج طفيلي *E.histolytica* عند فحص 27 عينة غائط موجبة الفحص المجهريا بأستخدام تقنية PCR وفي الأمارات العربية المتحدة قام Dash *et al*.,(2010) بدراسة أنتشار الأصابة بالطفيليات المعوية في الشارقة وسجلوا نسبة أصابة بلغت 71.8 % للنوع *E.histolytica*، اما في مصر فقد استخدم El-sobky *et al*. (2011) التقنية الجزيئية multiplex PCR لفحص 100عينة غائط لمرضى يعانون من حالات اسهال واضطرابات معوية وقد تم تسجيل نسبة اصابة بالنـوع *E. histolytica* بلغت 25 % ونسبة اصابة بالنوع *E. dispar* بلغت 41.7 واصابة مختلطة بالنوعين معا بنسبة بلغت 33.3 % ، وفي فلسطين سجل Hussien (2011) عند دراسته في انتشار الطفيليات المعوية بين طلاب المدارس في فلسطين في الضفة الغربية حيث كانت نسبة الإصابة بطفيلي الأميبا 9.7% ، كما سجل Dash *et al*. (2012) عند دراسته في الشارقة في الامارات العربية المتحدة نسبة خمج بلغت 71.8% بطفيلي الاميبا الحالة.

3-8-2 الوبائية في العراق

في العراق هناك العديد من الدراسات الوبائية التي شملت دراسة نسب انتشار الطفيليات المعوية في محافظات القطر، حيث بيّنت البياتي (2000) بدراسة اجرتها على تلاميذ بعض المدارس الابتدائية في محافظة ديالى - قضاء الخالص ، سجلت خلالها نسبة إصابة 24.4% بالأميبا، أما الفهداوي (2002) فقد قام بدراسة وبائية للتحري عن انتشار الطفيليات المعوية لدى المصابين بالإسهال المراجعين لمستشفى الرمادي العام ومستشفى الولادة والأطفال في مدينة الرمادي ، إذ بيّن ان النسبة المئوية للخمج كانت 25.3% ،

قام AL-Mosa (2002) بدراسة مشابهة في مدينة الحلة ، حيث قام بدراسة وبائية للمسببات الطفيلية لدى المصابين بالإسهال وبعض الاضطرابات المعوية المراجعين لعدد من المستشفيات في مدينة الحلة ، حيث بين ان نسبة الخمج ب بطفيلي *E. histolytica* كانت 27.5 % ، واظهرت السلامي (٢٠٠٥) في دراستها للطفيليات المعوية في محافظة القادسية بأستخدام الفحص المجهري ان الاصابة بالاميبا بلغت نسبة 24.57% ،وأوضحت الموسوي (2004) ان نسبة الإصابة بالأميبا الحالة للنسيج في محافظة كربلاء هي الاكثر شيوعاً من بين الطفيليات المعوية وبلغت 19.9% ، وفي مدينة الكوفة في النجف الاشرف وجد Sultan and AL-jeboori(2005) نسبة خمج بلغت 10.9% بطفيلي *E. histolytica*، وكذلك في مدينة دهوك فقد سجل AL-Saeed and Issa (2006) نسبة خمج بلغت 7.1% بطفيلي *E. histolytica* .

وفي مدينة البصرة قام الاسدي (2007) بتسجيل نسبة خمج بطفيلي *Entamoeba histolytica* بنسبة 65.2%، كما سجل السامرائي (2008) في مدينة سامراء نسبة خمج بلغت 20.7% بنفس الطفيلي. وقد سجل فتوحي وجماعته (2008) نسبة الانتشار للنوع *E. histolytica* بلغت 36.10% في محافظة نينوى عند دراستهم للطفيليات المعوية المسببة للإسهال وبعض المؤثرات عليها لدى الأطفال وذلك بفحص 600عينة غائط لأطفال مصابين بأعراض اضطرابات معوية وافدين الى مستشفى أبن الأثير في محافظة نينوى ولمدة ١٠ أشهر . وفي دراسة العبودي (2010) لوبائية الأمراض المعوية *Giardia lambilia* , *E. histolytica* بين مراجعي المراكز الصحية في ناحيتي الغراف والبطحاء التابعة لمحافظة ذي قار فقد سجلت نسبة الإصابة الكلية بالنوع *E.histolytica* (24.9)%. وفي تكريت سجل ناصر (2010) نسبة اصابة للجنس *Entamoeba* بلغت 17.03 % اي بواقع 54عينة من اصل 317عينة باستخدام الفحص المجهري وتم استخدام تقنية PCR التقليدي للتحري عن الانواع التابعة للجنس *Entamoeba* بفحص العينات الموجبة مجهريا وقد اشارت دراسته الى وجود اصابة مفردة بالنوع *E. dispar* بلغت 17.03 ونسبة اصابة مختلطة بالنوعين *E. dispar* , *E. moshkoviskii* بلغت 1.85 في حين لم تسجل اي اصابة بالنوع *E. histolytica* .

أما نايف وجماعته (2011) فقد سجلوا نسبة أصابة بلغت 53.18% عند فحصهم 800 عينة براز للمرضى المصابين بالاضطرابات المعوية والمراجعين لمستشفى مدينة الطب في بغداد ، وقد اشار (Al-Aumaishi *et al*., 2011) في دراستهم الجزيئية التشخيصة للاميبا الحالة واميبا الدسبار في محافظة القادسية بأستخدام تقنية PCR ان النوع الاول سجل وجوده بنسبة ١٨,٦% والنوع الثاني الدسبار بنسبة ٥٣%، كما أظهرت نتائج دراسة Hamad and Ramzy(2012) في أربيــل نسبة الإصابة بالأميــبا الحالة بلغت 30% باستخدام الفحص المجهري ودراسة Hama and Rahemo(2014)بنسبة أصابه بلغت 2.33 % بين الأطفال المصابين في المدارس في أربيل ايضاً، كما درس الجنابي والتكريتي (2014) انتشار الخمج بالأميبا الحالة للنسيج *E. histolytica* بين الأطفال المراجعين لمستشفى الطفل المركزي في مدينة بغداد وذلك بفحص 1712 عينة غائط من الأطفال المراجعين للمستشفى وقد أظهرت النتائج ان نسبة الإصابة بالأميبا الحالة كانت 18.72% في حين سجل Al-Kubaisy *et al* . (2014) في بغداد نسبة اصابة بطفيلي الاميبا في الاطفال المراجعين لثلاث مستشفيات في وسط محافظة بغداد بلغت 23.44% باستخدامهم طريقة الفحص المجهري، و اخيرا ما سجله (Al-Kahfaji (2014 عند فحصه 182 عينة غائط لمرضى مصابين بالاضطرابات المعوية باستخدام تقنية single round PCR بنسبة اصابة 47 % للنوع *E.*

histolytica و 31 % للنوع *E. dispar* و 19 % للنوع *E.moshkoviskii* و 2 % اصابات مختلطة.

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1- المواد Materials

3-1- 1- الأجهزة والمعدات Equipments and Instruments

الجدول (3-1): جميع الأجهزة والمعدات المختبرية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ.

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة (المنشـــأ)
١	باعث الأشعة فوق البنفسجية Ultra violet	San.Gabriel,USA
٢	جهاز تقطيرDistiller	Fisons(Japan)
٣	*Real-Time PCR* جهازالمدور الحراري Thermocycler	BioRad .USA
٤	Exispin vortex centrifuge جهاز الطرد المركزي	Bioneer/ Korea
٥	جهاز الدوران الحراري PCR Thermocycler	Bioneer/ Korea
٦	جهاز ترحيل كهربائي Gel electrophoresis	Shndon,scientific Co.LTD(England)
٧	جهاز حساب درجة الحرارة المثلى للبادئات Miniooption Real time PCR system	BioRad .USA
٨	جهاز اجراء تسلسل الحامض النووي AB DNA sequencing	Bioneer/ Korea
9	جهاز قياس نقاوة الحامض النووي Nanodrop	BioRad .USA

10	حمام مائي Water bath	Memmert (Germany)
11	شرائح زجاجية وغطاء الشريحة Slides and cover slides	Superestar(India)
١٢	دوارق مخروطية Conical flasks	BBL(USA)
١٣	صفيحة الحرارة الهزازة الممغنطة Magnatic hot plate stirrer	Bioneer/ Korea
١٤	كاميرا رقمية Digital camera	Sony (Japan)
١٥	مازج دوار Rotary Vortex	CYAN(China)
١٦	ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance	Gallen Kaamp(England)
١٧	مجمدة -20 Deep freezing	Concord (Lebanon)
18	مجهر ضوئي Light microscopic	Olympus (Japan)

٣- 2-1- المواد الكيمياوية Chemicals

الجدول (3-٢): جميع المواد الكيمياوية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ.

اسم المادة	الشركة وبلد المنشأ
ايثانول Ethanol	BDH (England)
ايزوبربانول Isopropanol	Biobasic/ Canada
اكار Agarose	BioBasic (Canada)
المعلم Ladder100bp	Bioneer/ Korea

BioBasic (Canada)	Ehidium Bromideبروميد الاثيديوم
Bioneer (Korea)	Loading dye صبغة التحميل
BioBasic (Canada)	TBE buffer محلول دارئ
Bioneer (Korea)	PCR water pcrماء

3-1-3- العُدد Kits

الجدول (3-3): يمثل جميع العُدد التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ.

ت	اسم العدة	مكوناتة	الشركة وبلد المنشأ
١	عدة استخلاص الحمض النووي من الغائط Stool DNA extraction Kit	GT Buffer 30 ml	Bioneer (Korea)
		GB Buffer 40 ml	
		W1 Buffer 45 ml	
		Wash Buffer 100 with ethanol	
		Elution Buffer 30 ml	
		GD Colum 100pcs	
		2ml collection tubes 100 pcs	
٢	عدة فحص Real-Time PCR AccuPower® Dualstar qPCR Master Mix	Standard 96 lyophilized 2X *Dual star* TaqMan qPCR Master tube contains (Master Mix including Hotstart *Top* DNA polymerase, dNTP, Tris-HCl (pH 9.0), KCl, $MgCl_2$,)	Bioneer (Korea)

	DEPC water		
Bioneer (Korea)	Single-tube lyophilized 2X *GreenStar* qPCR Master tube contains (Master Mix including SYBR Green I dye, Hotstart *Top* DNA polymerase dNTP, Tris-HCl (pH 9.0), KCl, $MgCl_2$,)	عدة فحص Real-Time PCR AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master Mix	٣
	DEPC water		
Bioneer (Korea)	Top DNA polymerase dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Tris-HCl (pH 9.0), KCl, $MgCl_2$, and Stabilizer and tracking dye	عدة فحص AccuPower ® PCR Premix	٤

3-1-4- البادئات والمجسات التشخيصية Primers and Probes

صممت البادئات والمجسات الخاصة بجين 18S rRNA المسؤول عن تشخيص أنواع طفيلي *Entamoeba* في عينات براز الإنسان باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل بالوقت الحقيقي-Real Time PCR حيث تم استخدام موقع بنك الجينات Genbank-NCBI للحصول على التسلسل الكامل للجين 18S rRNA gene الخاص بكل نوع من أنواع طفيلي *Entamoeba* وباستخدام برنامج Primer3plus تم تصميم البادئات وقد تم تجهيز البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية:

الجدول (3-4): يمثل البادئات التي استخدمت في هذا الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي وناتج فحص PCR :

1- *Entamoeba histolytica*

Primer	Sequence	
E.H-ssrRNA primer	F	**GAATTGACGGAAGGGCACAC**
	R	**AACTAAGAACGGCCATGCAC**
E.H-ssrRNA probe	**FAM-CAGGAGTGGAGCCTGCGCTT-BHQ1**	

E.histolytica gene for small subunit rRNA
GenBank: X64142.1

2- *Entamoeba dispar*

Primer	Sequence	
E.D-ssrRNA primer	F	**ACCAAGACCGAACAGTAGAAGG**
	R	**GTTTCAGTCTCGTTCGTTACCG**
E.D-ssrRNA probe	**FAM-TGGGTAGTGGTGCATGGCCG-BHQ1**	

E.dispar gene for small subunit rRNA
GenBank: Z49256.1

3- *Entamoeba moshkovskii*

Primer	Sequence	
E.M-ssrRNA primer	F	**GCGGACGGCTCATTATAACAG**
	R	**TCAGAATGGCATTCGCACTC**
E.M-ssrRNA probe	**FAM-GTCGGCCACTCTCTTCACGGG-BHQ1**	

Entamoeba moshkovskii 16S-like small subunit rRNA gene, complete sequence
GenBank: AF149906.1

3-1-5- البادئات الخاصة بجينات الضراوة Primers

صممت البادئات الخاصة بجينات الضراوة Virulence المستخدمة في هذه الدراسة وهي (cysteine protease, amoebapore, Gal/lectin) والتي تستخدم في تقنية تفاعل البلمرة في الوقت

الحقيقي Real-Time PCR based Sybergreen حيث تم استخدام موقع بنك الجينات -GenBank NCBI وباستخدام برنامج Primer3plus و تصميم البادئات وتجهيزها من قبل شركة Bioneer الكورية:

الجدول (3-5): يمثل البادئات التي استخدمت في هذا الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي وناتج فحصPCR:

Primer	**Sequence**	
cysteine protease	**F**	**GCTGTTGCTGGTACTTGCAAG**
	R	**ACAGCAACAGGTCCGTTTTC**
amoebapore	**F**	**TGCCTTTGCTGCAACAAGAG**
	R	**ACAGCTTGAGCACCATCAAC**
Gal/lectin	**F**	**GACGCACCAGGTACTCAAAATC**
	R	**AACCCATCTTCCACCCTGATTG**

3-1 -6- البادئات المستخدمة في فحص التسلسل النووي DNA Sequencer Primers

صممت البادئات لفحص التسلسل النووي الخاصة 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 الخاص بكل نوع من أنواع طفيلي *Entamoeba* وباستخدام برنامج Primer3plus في تصميم البادئات وقد جهزت البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية:

الجدول (3-6): يمثل البادئات التي استخدمت في هذا الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي وناتج فحصPCR:

Primer	**Sequence**		**AMPLICOM**
E. histolytica	**F**	**AACTGCGGACGGCTCATTAT**	**1742bp**
	R	**TTCAATCGGTAGGAGCGACG**	
E. dispar	**F**	**ATCTGGTTGATCCTGCCAGT**	**1795bp**
	R	**AAAGGGCAGGGACGTATTCA**	

E.moshkoviskii	**F**	**AAACTGCGGACGGCTCATTA**	**1743bp**
	R	**TTCAATCGGTAGGAGCGACG**	

3-2- طرائق العمل Methods

3-2-1- جمع عينات البراز Stool samples collection

جمعت عينات الغائط من المرضى الذين يعانون من اضطرابات معوية والام بطنية وحالات اسهال من المراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى الولادة والاطفال وبعض المختبرات الطبية الخارجية في مركز المدينة وضواحيها للمدة من الاول من اذار 2014 ولغاية الاول من ايلول 2014 , وقد تم خلال هذه المدة جمع 679 عينة من مختلف الفئات العمرية تراوحت بين 1سنة – اكثر من 65 سنة , وقد جمعت عينات الغائط في علبة صغيرة بلاستيكية معقمة بحجم 20 مل ذات فوهه عريضة وغطاء محكم للحفاظ على رطوبة العينه والعلبة مدون عليها رقم العينة وتاريخ الجمع , فحصت العينات بالمجهر الضوئي في مختبر المستشفى باستخدام طريقة المسحة المباشرة الرطبة خلال مدة لا تتجاوز النصف ساعة من وقت الحصول عليها وبناءا على ذلك تم حفظ العينات الموجبة دون اضافة اي مواد حافظة في المجمدة بدرجة حرارة -20 درجة مئوية لحين بدء عملية استخلاص الحامض النووي DNA منها واخضاعها للفحص الجزيئي.

3-2-2– طريقة التشخيص المختبري Laboratory Diagnosis

3-2-2-1 الفحص العياني Macrosopic Examination

يتضمن هذا الفحص ملاحظة عينات البراز من حيث اللون والقوام ووجود دم أو مخاط مصاحب للعينة أو خلاف ذلك.

3-2-2-2- الفحص المجهري Microscopic Examination

تم فحص النماذج بطريقة المسحة الرطبة المباشرة (Direct wet smear) TanyuKsel *et al.* (2005) والتي تشمل :

1- المسحة المحضرة بالمحلول الملحي الفسيولوجي:

تعد هذه الطريقة مفيدة على وجه الخصوص للتحري عن الناشطات Trophozoites الحية المتحركة اذ تم أخذ جزء صغير من عينة البراز بطرف عود خشبي صغير stick واضيف اليها قطرة من المحلول الملحي الفسلجي موضوعة على شريحة زجاجية نظيفة وبعد المزج الجيد تم وضع غطاء الشريحة للحيلولة دون تكون فقاعات هوائية , ويتكون المحلول المحلي من ملح الطعام (كلوريد الصوديوم) Sodium chloride 0.85 غرام, ماء مقطر Distilled water و أكمل الحجم الى 100 مليلتر) .

2- المسحة المحضرة بمحلول اليود اللوكالي:

استخدمت المسحة المحضرة بمحلول اليود لصبغ الاطوار المتكيسة للأميبا وخاصة النواة اذ ان صبغة اليود تساعد في تأكيد وجود الاكياس من خلال تصبغ الفجوات الكلايكوجينية والانوية بصورة واضحة وبالتالي التميز بين الاطوار المتكيسة لانواع الاميبات الموجودة في امعاء المصاب وتم تحضير الشرائح للفحص بنفس الطريقة السابقة ويتكون من بلورات اليود Iodine crystals 5غرام, يوديد البوتاسيوم Potassium iodide 10غرام, ماء مقطر Distilled و أكمل الحجم الى ١٠٠ مليلتر.

3-2-3-استخلاص الحمض النووي DNA من البراز Stool DNA extraction

تم أجراء استخلاص الحمض النووي من عينات البراز وذلك باستخدام عدة الاستخلاص الخاصة بالبراز Stool Genomic DNA extraction kit والمجهزة من شركة Bioneer الكورية, وتم أجراء عملية الاستخلاص حسب تعليمات الشركة وكآلاتي:

١- اضيف20مايكرو ليتر من انزيم البروتينيز Proteinase K الى انابيب معقمة سعة 1.5 مل الى حاويه من عينات الغائط .

٢- نقل 200 مايكرو غرام من عينة البراز الى الانابيب الحاوية على الانزيم ومن ثم اضيف محلول 400 مايكروليتر من محلول داريء تحليل البراز Stool lysis buffer ومزجت جيدا بواسطة جهاز المازج الدوار Vortex لمدة 30 ثانية.

٣ - حضنت العينات بدرجة 60 مئوية لمدة 10 دقائق.

٤- أضيف 200 مايكروليتر من محلول داريء الرابط Binding buffer الى كل عينة ومزجت جيدا بواسطة جهاز المازج الدوار Vortex لمدة 10 دقائق..

٥- حضن العينات بدرجة 60 مئوية لمدة 30 دقيقة.

٦- اضيف 200 مايكروليتر من الكحول الاثيلي المطلق ومزجت جيدا بواسطة جهاز المازج الدوار Vortex لمدة 15 ثانية.

٧- نقل المزيج إلى أنابيب خاصة مجهزه مع العدة تدعى عمود الرابط Binding column الموضوعة بداخل أنابيب جامعة collection tubes سعة 2 مل ومن ثم وضعت هذه الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 8000/ دورة / دقيقة (RPM) لمدة دقيقة واحدة ومن ثم تم التخلص من المحلول الراسب.

٨- أضيف 500 مايكروليتر من محلول الغسل Washing buffer1 ووضعت هذا الأنابيب في جهاز النبذ المركزي بسرعة 8000 / دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة ومن ثم تم التخلص من المحلول الراسب.

٩- أضيف ٥٠٠ مايكروليتر من محلول الغسل Washing buffer2 ووضعت هذه الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000/ دورة / دقيقة (RPM) لمدة 3 دقائق ومن ثم تم التخلص من المحلول الراسب.

١٠ اخيرا نقلت أنابيب عمود الرابط Binding column الحاوية على الحمض النووي الى انابيب معقمة سعة 1.5 مل ومن ثم تم اضيف محلول ال 50 مايكروليتر من محلول Elution buffer ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 8000 / دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة وذلك لاذابة الحمض النووي.

١١ حفظ الحمض النووي بدرجة حرارة -20 تحت الصفر في المجمدة لحين اجراء فحص الجزيئي

.

3-2-4-فحص تركيز ونقاوة الحمض النووي المستخلص DNA profile

تم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص من عينات البراز وذلك من خلال استخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) الخاص بالكشف وقياس تركيز الاحماض النووية (DNA and RNA) حيث يتم الكشف الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي DNA (ng\µl) وقياس نقاوة الحمض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتـــراوح بين 260-280 نانو ميتر وتم استخدام الجهاز النحو التالي :

١- بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع DNA .

٢- تصفير ركيزة المقياس مرتين باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع 1 مايكروليتر من(ddH2O) باستخدام ميكروبايبيت معقمة على سطح ركيزة المقياس وجراء التصفير وقمنا بتنظيف الركيزة لقياس العينات.

٣- الضغط على زر ok لبدء عملية قياس تركيز الالحامض النووي DNA وذلك باستخدام 1 ميكروليتر من كل عينة من عينات DNA المستخلص ومن ثم قمنا بتنضيف ركيزة المقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.

٤- تحديد نقاوة عينات الحامض المستخلص بقراءة الامتصاصية لجهاز Nanodropعلى طولين موجيين (260/280 nm) حيث ان الحمض النووي DNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

3-2--5- طريقة التشخيص باستخدام تقنية Real-Time PCR

تم أجراء تقنية Real-Time PCR باستخدام البادئات والمجسات الخاصة بجينات 18S rRNA المسؤول عن تشخيص أنواع طفيلي *Entamoeba* من عينات براز الإنسان وذلك حسب طريقة (Lau *et al*.(2013 والتي تمثل في عدة خطوات:

3-2- 5-1- تحضير مزيج Real-Time PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل Real-Time PCR باستخدام عدة ال AccuPower® Dualstar qPCR Master Mix المجهزه من قبل شركة Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة وكما في الجدول (3-7) :

الجدول (3-7) مكونات تفاعل Real-Time PCR

PCR master mix المزيج	**Volume الحجم**
DNA template	5µL
Forward primer 10pmol	1µL
Reverse primer 10pmol	1µL
TaqMan probe 10pmol	2µL
DEPC water	9µL
Total	**١٨µL**

بعد ذلك تم وضع مكونات مزيج تفاعل Real-Time PCR التي ذكرت في الجدول أعلاه الى أنابيب بيضاء معتمة حجم 0.2ml خاصة بجهاز Real-Time PCR ومن ثم نقلت جميع الانابيب الى جهز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge (Exispin) بسرعة 3000/ دورة / دقيقة لمدة ثلاثة دقائق وثم وضعت في جهاز Real-Time PCR .

3-2 -5-2- حالات الدورات الحرارية .

Real-Time PCR Thermocycler conditions

تم تطبيق برنامج الدورات الحرارية لفحص Real-Time PCR وذلك بالاعتماد على تعليمات عدة AccuPower® Dual star qPCR Master Mix وكذلك من خلال حساب درجة الحرارة المثلى Temperature البادئات وذلك باستخدام جهاز MiniOpticon Real-Time PCR system BioRad. USA.كما في الجدول ادناه (3-8):

الجدول(3-8) : برنامج الدورات الحرارة للتفاعل بتقنية Real-Time PCR .

qPCR step خطوات	درجة الحرارة Temperature	الوقت Time	Repeat عدد Cycle الدورات
Initial Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	10 sec	45
Annealing\Extention Detection(scan)	58 °C	30 sec	

3-2- 5-3- تحليل نتائج فحص ال Real-Time PCR

تم تحليل نتائج فحص ال Real-Time PCR وذلك من خلال منحى التضخم Amplification plot المعتمد على رقم خط جهد العتبه Throushold cycler number (CT) value حيث تكون العينة موجبة عندما تتجاوز خط العتبة .

3- 2-6- طريقة فحص Real-Time PCR لجينات الضراوة

تم أجراء تقنية Real-Time PCR باستـــخدام البادئات الخاصة ببعض جينات الضراوة (cysteine protease, amoebapore, and Gal/lectin) وذلك حســب الطريقة المستخدمة من قبل (Al-Torfi, 2014) كما في عدة خطوات:

3-2-6-1- مزيج تفاعل Real-Time PCR الخاص بجينات عوامل الضراوة

تم تحضير مزيج تفاعل Real-Time PCR باستخدام عدة ال AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master Mix المجهزه من قبل شركة Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة ;كما في الجدول (3-9) :

الجدول (3-9) مزيج التفاعل الخاص بدراسة عوامل الضراوة .

PCR master mix المزيج	Volume الحجم
2X GreenStar master mix	25 µL
DNA template	5µL
Forward primer 10pmol	2.5 µL
Reverse primer 10pmol	2.5 µL
DEPC water	15µL
Total	**50µL**

بعد ذلك تم وضع مكونات مزيج تفاعل Real-Time PCR التي ذكرت في الجدول أعلاه الى أنابيب بيضاء معتمة حجم 0.2ml خاصة بجهاز ال Real-Time PCR ومن ثم ونقلت جميع الانابيب الى جهز الطرد المركزي المازج (Exispin) vortex centrifuge بسرعة 3000/ دورة / الدقيقة لمدة ثلاثة دقائق وثم وضعت في جهاز Real-Time PCR

2-3 -2-6-حالات الدورات الحرارية

Real-Time PCR Thermocycler conditions

تم تطبيق الدورات الحرارية لفحص ال Real-Time PCR وذلك بالاعتماد على تعليمات عدة AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master Mix وكذلك من خلال حساب درجة الحرارة المثلى Tembrecher للبادئات وذلك باستخدام جهاز ال MiniOpticon Real-Time .PCR system BioRad. USA كما في الجدول (3-10):

الجدول (3-10) : الدورات الحرارية لفحص ال Real-Time PCR.

qPCR step الخطوات	درجة الحرارة Temperature	الوقت Time	عدد Repeat الدورات cycle
Initial Denaturation	95 °C	3 min	1

Denaturation	95 °C	10 sec	45
Annealing\Extention Detection(scan)	58 °C	30 sec	
Melting	65-95°C	0.5 sec	1

-7-2-3 طريقة تسلسل الحمض النووي DNA sequencer method

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

1-7-2-3 تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمره باستخدام عدة AccuPower® PCR PreMix المجهزه من قبل شركة Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة كألاتي:

1- حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمره في انابيب PCR المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمره وضيفت المكونات الاخرى لمزيج تفاعل وحسب تعليمات الشركة .كما في الجدول (3-11):

الجدول (3-11) أدناه الذي يوضح مكونات مزيج PCR master mix .

PCR master mix المزيج	**Volume الحجم**
DNA template	5µL
Forward primer (10pmol)	1.5µL

Reverse primer (10pmol)	1.5µL
PCR water	12µL
Total	**20µL**

٢- بعد اكمال تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمره تم غلق الانابيب ومزجت بعناية بجهاز المازج vortex لمدة ٥ ثواني.

٣- نقلت الأنابيب لجهاز المدور الحراري PCR Thermocycler لأجراء حالات الدورات الحرارية PCR thermocycler conditions .

3-2-7-2- حالات الدورات الحرارية PCR Thermocycler conditions

تم جراء فحص ال PCR باستخدام جهاز PCR Thermocycler. وتم برمجة الجهاز كما في الجدول (3-12): الدورات الحرارية **PCR Thermocycler conditions**.

PCR Step الخطوات	درجة الحرارة **Temperature**	**Time** الوقت	عـــــدد الدورات **Repeat cycle**
Initial denaturation	95C	5min	1
Denaturation	95C	5sec.	30
Annealing	58C	30sec	
Extension	72C	3min	
Final extension	72C	10min	1
Hold	**4C**	**Forever**	**-**

3-2-7-3 الترحيل الكهربائي في الهلام Gel electrophoresis

تم اجراء الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وذلك لقراءة ناتج تفاعل سلسلة البلمره PCR product analysis وكما يأتي:

1- اذابة 1.5 غم من هلام الاكلروز Agarose gel في 100 مل من محلول ال TBE buffer الدارئ بتركيز 1X وباستخدام الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة ١٥ دقيقة.

٢- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50م وبعدها تم إضافة صبغة الاثيديوم بروماید المشعة Ethidium bromide ومزجت جيدا مع الهلام.

٣- صب هلام الاكروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb لتحديد اماكن عينات pcr, وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ومن ثم ازيل المشط من الهلام بعناية.

٤- استخدم سلم القياس 100 DNA ladder لقياس ناتج PCR .

٥- تحميل عينات ناتج pcr ١٠ مايكروليتر لكل عينة.

٥- بعد اكتمال عملية التحميل تم غمر هلام الاكروز باستخدام محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام تيار 100فولت و 80 أمبير لمدة ساعة واحده.

٥- بعد انتهاء عملية الترحيل 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.

3-2-7-4- طريقة التتابع الجيني لحامض DNA Sequencer

بعد اجراء فحص PCR تم ارسال ناتج تفاعل PCR product الى شركة Bioner 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 النتروجينـــية لمورثة 18s r RNA في العينات المدروسة.

3-3- التحليل الاحصائي

اخضعت جميع النتائج التي تم الحصول عليها في هذه التحليل الاحصائي باستخدام اختبار مربع كاي Chi – square وبينت مستوى الاحتمالية عند ($p \leq o.o5$) (Petri and Watson, 2004) .

1-4 النتائج Results

2-4 نسبة الاصابة بطفيلي الاميبا بواسطة الفحص المجهري :

اظهرت النتائج ان 416 عينة فقط كانت تحوي على طفيلي الاميبا بطوره المتغذي أو المتكيس او كليهما وقد كانت نسبة الاصابة بطفيلي الاميبا 61.26% في حين كانت نسبة العينات السالبة للطفيلي 38.74%، والجدول (٤-١) يبين عدد العينات والنسبة المئوية للاصابة:

الجدول (1-4) نسبة الخمج بطفيلي الاميبا باستخدام الفحص المجهري

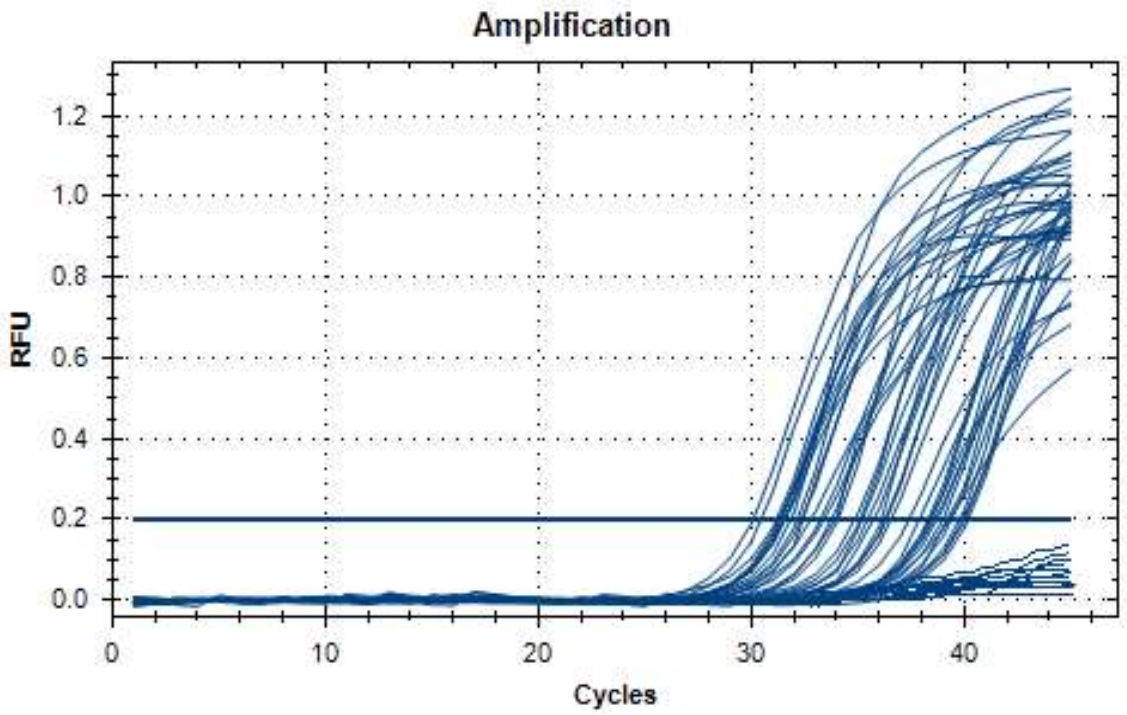
الطفيلي	عدد العينات	النسبة المئوية
العينات الموجبة لطفيلي الاميبا	416	61.26
العينات السالبة لطفيلي الاميبا	263	38.74
المجموع الكلي	679	100.00

3-4 نسبة الاصابة بطفيلي الاميبا باستخدام تقنية Real Time - PCR :

اثبتت النتائج وجود ثلاثة انواع وهي*E.histolytica* *E.dispar* *E. moshkoviskii* وكما يلي :

1-4-4النوع *E. histolytica*

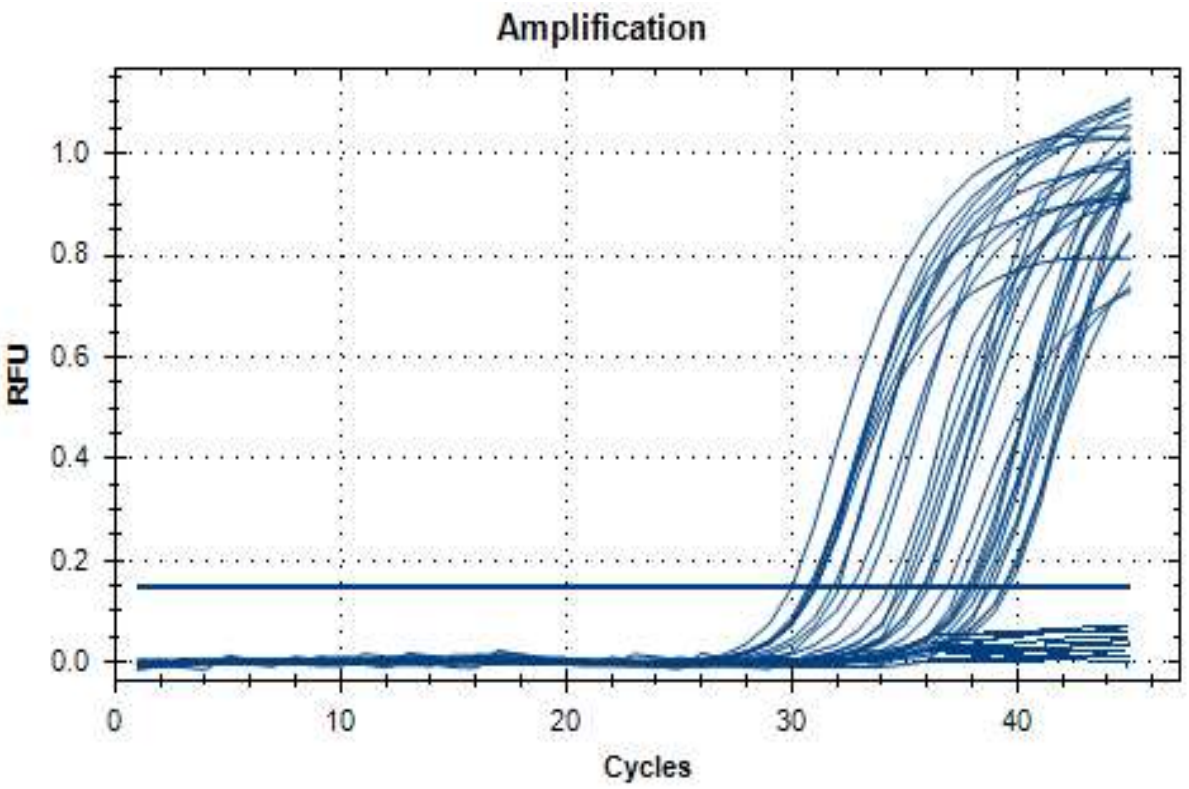
اظهرت نتائج الفحص الجزيئي للعينات الموجبة مجهريا وجود هذا النوع في 148عينة اي بنسبة 74 % من مجموع عدد العينات الموجبة الكلـــية والبالغة 200عينة، والشكل (1-4) يوضـــح منحنى التضـــخم لنتـــائج التفاعل بتقنية Real time PCR للعيـــنات موجبة التشـــخيص للطـــفيلي *E. histolytica* بواسطة جين 18s r RNA gene حيث يمثل المحور الصادي RFU وحدة قياس الصبغة في حين يمثل المحور السيني الدورات الحرارية للتفاعل .



الشكل (4-1): منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR لنتائج الموجبة لتشخيص طفيلي *E. histolytica* بواسطة جين 18s r RNA gene

2-4-4 النوع *E. dispar*

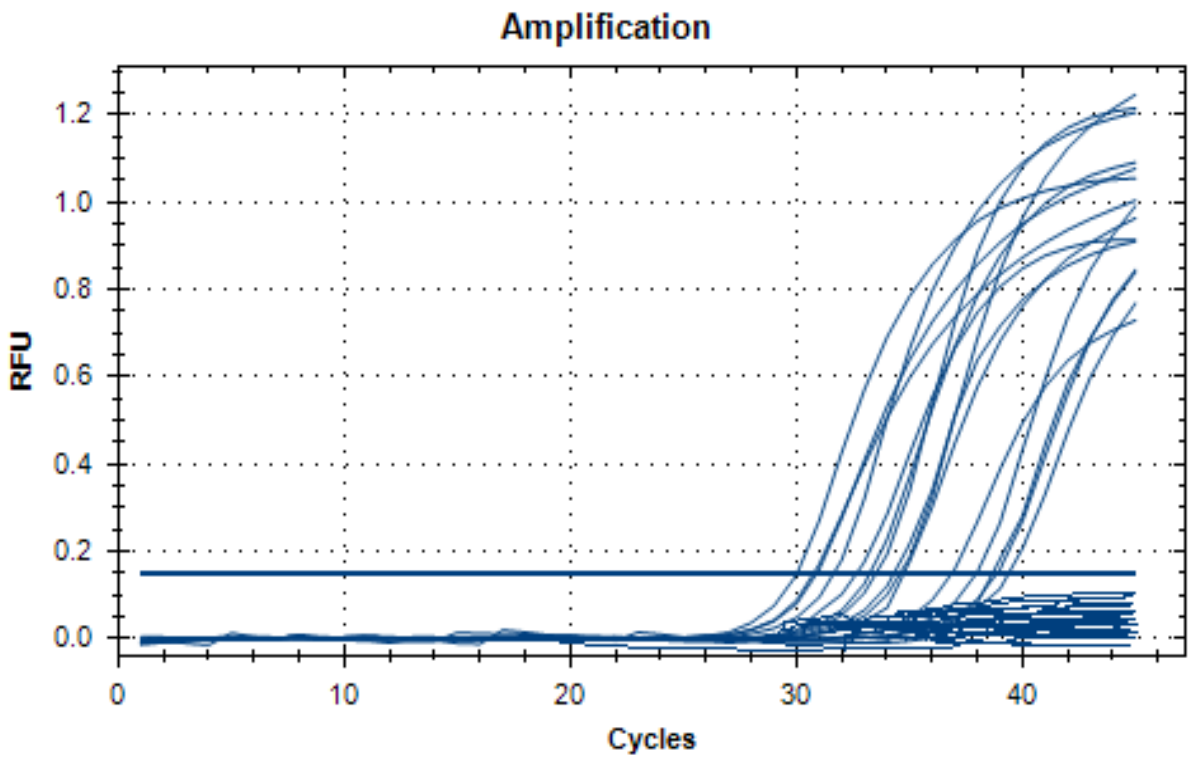
بينت نتائج الفحص الجزيئي للعينات الموجبة مجهريا وجود هذا النوع في 52 عينة اي بنسبة 26% من اصل 200عينة موجبة و يوضح الشكل (4-2) منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR للنتائج الموجبة لتشخيص طفيلي *E. dispar* بواسطة جين 18S rRNA gene



الشكل (4-2): منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR لنتائج الموجبة لشخيص طفيلي *E. dispa*r بواسطة جين 18S rRNA gene

3-4-4 النوع *E. moshkoviskii*

اظهرت نتائج الفحص الجزيئي للعينات الموجبة مجهريا وجود النوع المذكور في 14عينة اي بنـسبة 7 % من مجموع العينات الموجبة الكلية و البالغ عددها 200عيـــنة والشـكل (4-3) يوضح منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR لنتائج الموجبة لشخيص طفيلي *E. moshkovskii* بواسطة جين 18SrRNA gene .



الشكل (4-3): منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR لنتائج الموجبة لتشخيص طفيلي *E. moshkovskii* بواسطة جين 18SrRNA gene .

4-4 الاصابات المفردة والمختلطة لأنواع الاميبا تبعا للتشخيص الجزيئي باستخدام تقنية RT. PCR :

سجلت الدراسة الحالية اصابات مفردة لنوع واحد فقط من الانواع الـــثلاث للأميبا لدى بعض المصابين وكانت اعلى نســبة اصابة مفردة سجلت للنوع *E. histolytica* بنسبة 56% تليــها الاصابة المفردة بطــفيلي *E. dispar* بنسـبة 10% ثم الاصـــابة بطفــيلي *E. moshkoviskii* بنسبة 1% ،وقد اظهرت النتائج الاحصائية وجود فرق معنوي في نسب الاصابة المفردة بين الانواع الثلاث تحت مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ وكما في الجدول(4-2):

الجدول (4- 2) نسبة الاصابة المفردة للأنواع الثلاث لطفيلي الاميبا

حسب نتائج التشخيص الجزيئي

نوع الطفيلي	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية
E. histolytica	112	%56a
E. dispar	21	% 10b
E. moshkoviskii	3	%1 c

*تشير الحروف المختلفة الى وجود الفروق المهمة احصائيا تحت مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$)

اما فيما يخص الاصابات المختــلطة فقد سجــلت اعلى نسبة اصابة مختلــطة لكل من *E. histolytica* و *E. dispar* اذ كانت نسبة الاصابة في هذه الحالة 14% تليها نسبة اصابة مختلطة للنوعين *E. histolytica* و*E. moshkoviskii* وكانت النسبة 4% في حين سجلت اقل نسبة اصابة مختلطة كانت للنوعين *E. dispar* و *E. moshkoviskii* بنسبة 2% وقد وقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فرق معــنوي في نســب الاصابة المفردة بين *E. histolytica* و *E. dispar* وبقية اشكال الاصابات المختلطة في حين اظهرت النتائج عدم وجود فرق معنوي بين كل من الحالتين سواء كانت اصابة مختلطة *E.histolytica* و*E. moshkoviskii* و حالة الاصابة بالنوعين *E. dispar* و *E. moshkoviskii* تحت مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ وكما هو في الجدول (4-3):

الجدول (4-3) نسبة الاصابة المختلطة للأنواع الثلاث لطفيلي الاميبا

حسب نتائج التشخيص الجزيئي

نوع الطفيلي	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية
E. histolytica +*E.dispar*	28	%14a
E.histolytica + *E. Moshkoviskii*	8	% 4b
E.dispar + *E.moshkoviskii*	4	%2 c

*تشير الحروف المتشابهة الى عم وجود الفروق المهمة احصائيا في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود الفروق المعنوية تحت مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$)

4- 5 الاعراض المرضية المصاحبة للإصابات المفردة بأنواع جنس الاميبا الثلاث

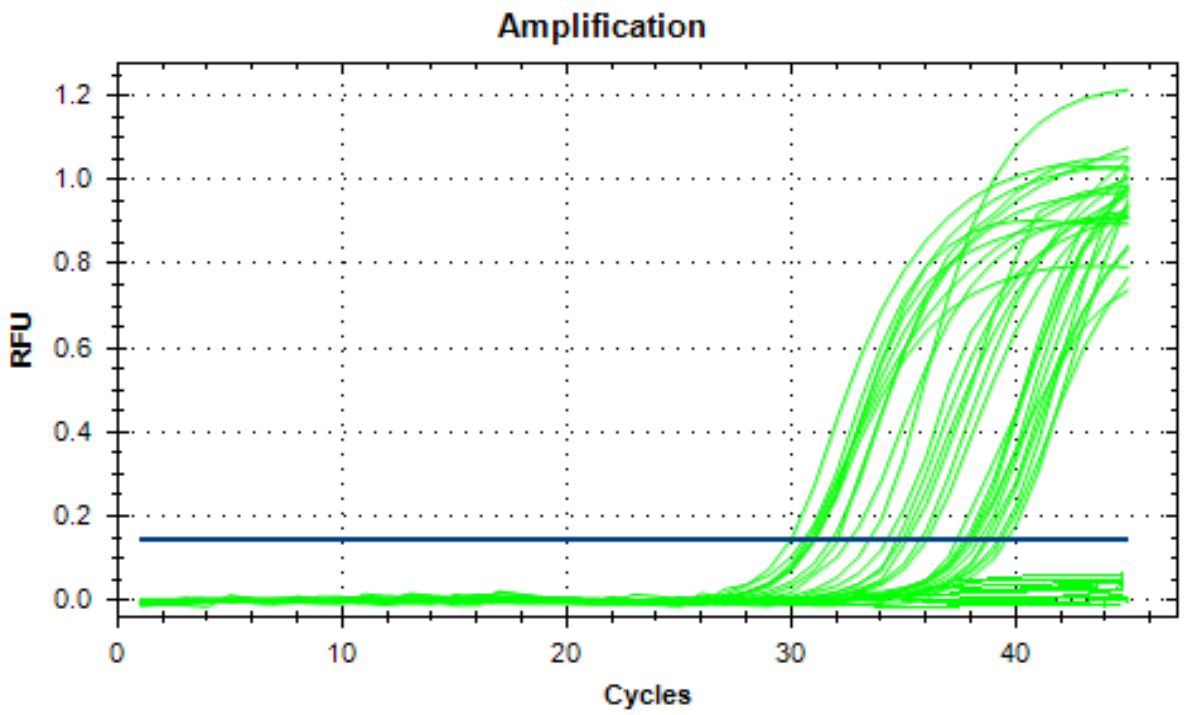
بينت الدراسة الحالية ظهور الاعراض المرضية المتمثلة بحالات الاسهال الحاد تراوح قوامه بين المخاطي و المائي أما لونه فقد تباين بين اللون البني والبني المحمر وحالات الاسهال الدموي، والاضطرابات المعوية و فقدان الوزن وألم في البطن تتراوح من المغص الشديد الى حالات اخرى اقل شدة يصاحبها ارتفاع طفيف في درجات الحرارة، وقد تمثلت هذه الاعراض بوضوح في المرضى المصابين اصابة مــفردة بالنوع *E. histolytica* والذين بــلغ عـــددهم 112 مريض اصل 200 مريضا خضعت عينات الغائط لهم للفحص الجزيئي، في حين لوحظ ان المرضى المصابين اصابة مفردة بالنوع *E. dispar* والذين بلغ عددهم 20 مصابا من اصل 200مصاب يعانون من اضطرابات معوية وحالات اسهال متكررة بلون تراوح بين الاصفر الشـــاحب والبـــني و قوام شبـــه مائي و ألم في البـــطن، أما المرضى المصابـــين بالنـــوع *E. moshkoviskii* كإصابة مفردة والذين بلغ عددهم ثلاث اشخاص فقط (طفلان احدهما انثى بعمر سنة و ثمان شهور و ذكر بعمر سبع سنوات و امرأة بعمر 42 سنة) فقد لوحظ انهم كانوا يعانون من حالات اسهال متوسط متوسط ذو قوام مخاطي نوعا ما تراوح لونه بين الاصفر والبني، كما يعانون من فقدان في الوزن و ألم في البطن ، مما يشير الى ان المصابين بالأنواع الثلاث قيد الدراسة كإصابة مفردة ظهرت عليهم الاعراض المرضية بوضوح .

4- 6 التحري عن عوامل الضراوة للانواع الثلاث:

تم عزل العينات التي ثبتــت فيها الاصابة المفــردة لكل نوع مــن انواع الاميبا مسبــقا وفق تقنــية التشخيص الجزيئي (Taq man prob) R.T-PCR واستخدمت للتحــري عن جينــات عوامــل الضراوة الثـلاث وهي Gal\Gal Nac , cysteine proteinase 1, ameboporeA (lactin) في كل نوع من انواع الاميبا باستخدام البادئات الخاصة بجينات العوامل بتقنية التشخيص الجزيئي (syber green) R.T-PCR وتبين ما يلي:

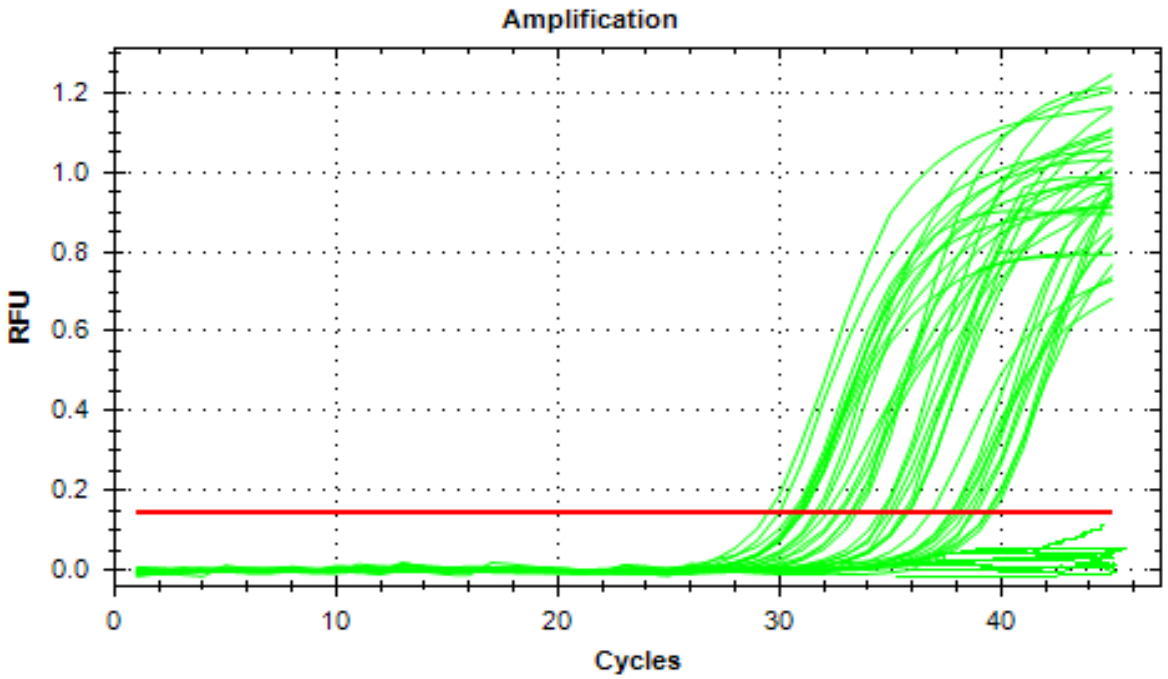
1-6-4 عوامل الضراوة في طفيلي *E. histolytica*

اثبتت الدراسة الحالية امتلاك الطفيلي *E. histolytica* لعوامل الضراوة الثلاث قيد الدراسة باستخدام تقنية Real Time PCR باستخدام البادئات الخاصة بجينات العوامل, حيث أكدت نتائج الفحص الجزيئي وجود عامل الضراوة Cysteine proteinase1 في 97 عينة من اصل 112 عينة اي بنسبة 86.6% والشكل (4-4) يوضح منحــنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR للنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة Cysteine proteinase1 :



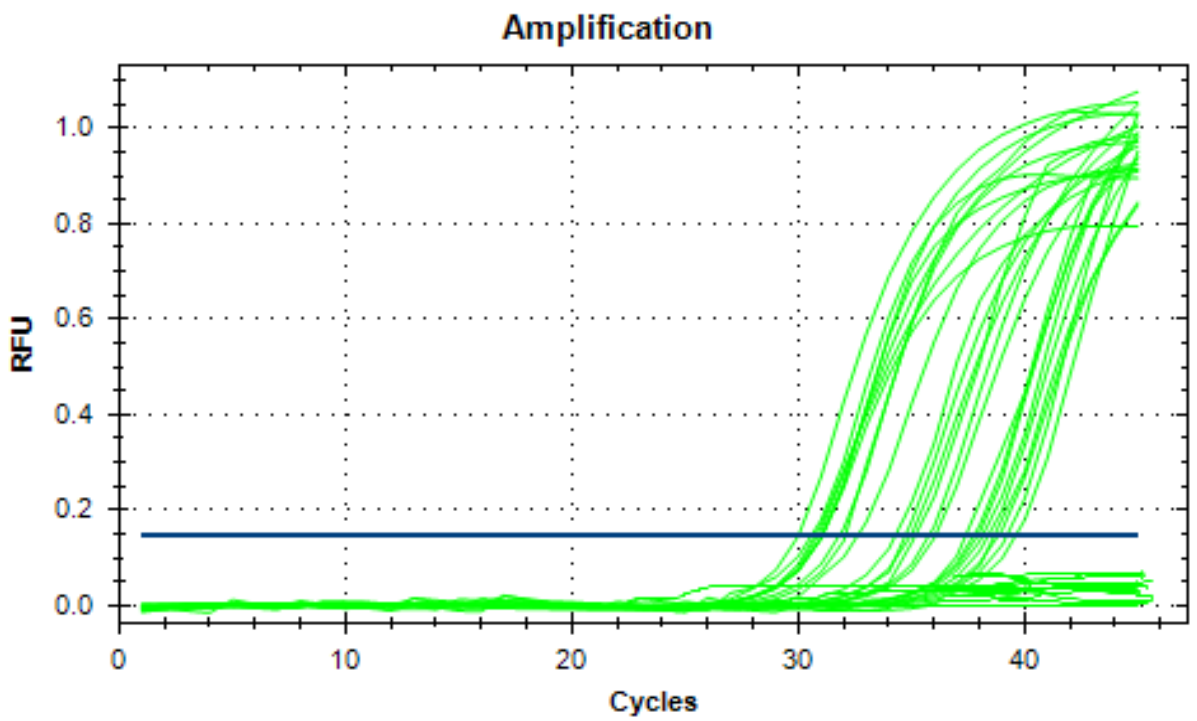
الشكل (4-4): منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR لنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة١ Cysteine proteinase في *E. histolytica* .

كما اثبتت النتـــائج وجود الجين لعـــامل الضراوة Amebopore A في 90 عينة من اصل 112عيـــنة ذات اصابة مفردة بالنـــوع *E. histolytica* اي بنسبة 80.35% ، والشكل (5-4) يوضح منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR للنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة (amoebapore A) :



الشكل (5-4): منحنى التضخم Amplification plot لفحص Real-Time PCR للنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة amoebapore A في النوع *E. histolytica*

اما بالنسبة لجين لعـــامل الضراوة Gal/ Gal Nac lactin في طفيلي *E. histolytica* فقد اشارت النتائج الى وجوده في٤٨ عينة من اصل 112عينة أي بنسبة % 42.8 ، والشكل (6-4) يوضح منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR للنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة Gal/ Gal Nac lactin :



الشكل (4-6): منحنى التضخم Amplification plot لفحص Real-Time PCR للنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة Gal/ Gal Nac lectin في النوع *E. histolytica* .

وقد سجلت اعلى نسبة لعزل جين العامل cystiene proteinase1 وكانت 86.6 % في حين كانت نسبة وجود جين Amebopore 80.35 % اما جين عامل Gal/ Gal Nac lectin فكانت نسبته الاقل وتساوي 24.8% ، وقد اظهرت النتائج الاحصائية عدم وجود فرق معنوي بين نسب عزل الجينات الثلاث تحت مستوى احتمالية (0.05)، وكما هو في الجدول (4-4):

الجدول (4-4) نسب وجود عوامل الضراوة في طفيلي *E. histolytica*

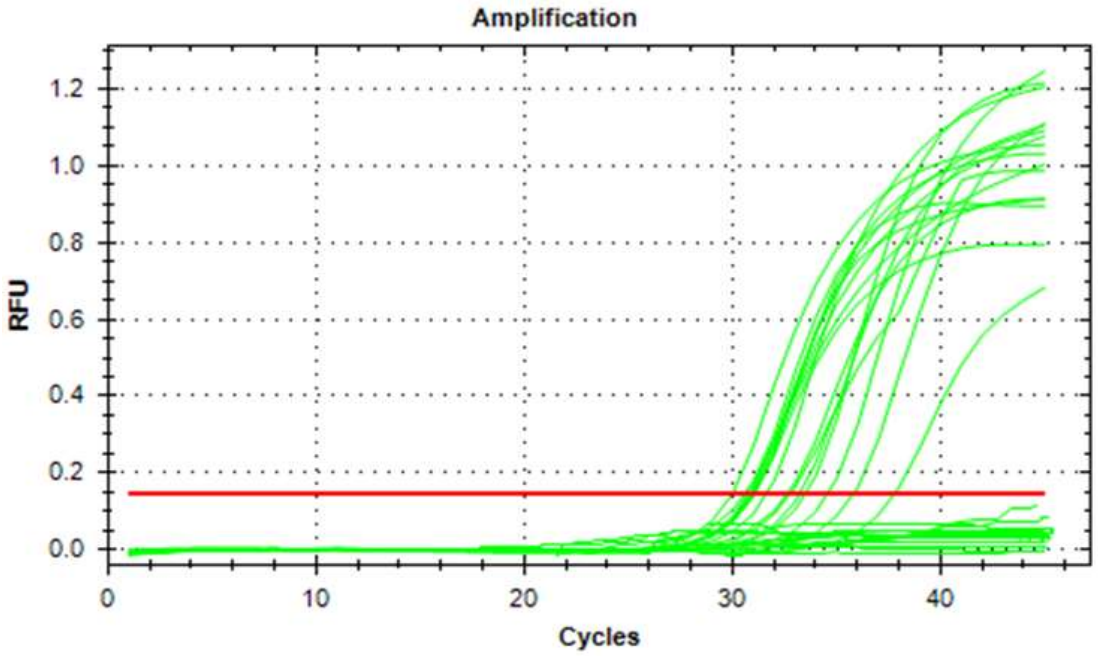
(112)عينة

عامل الضراوة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية
Cystiene proteinase1	97	%86.6 a
Amebopore	90	%80.35a
Gal/ Gal Nac lectin	84	%42.8a

*تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود الفروق المهمة احصائيا تحت مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$)

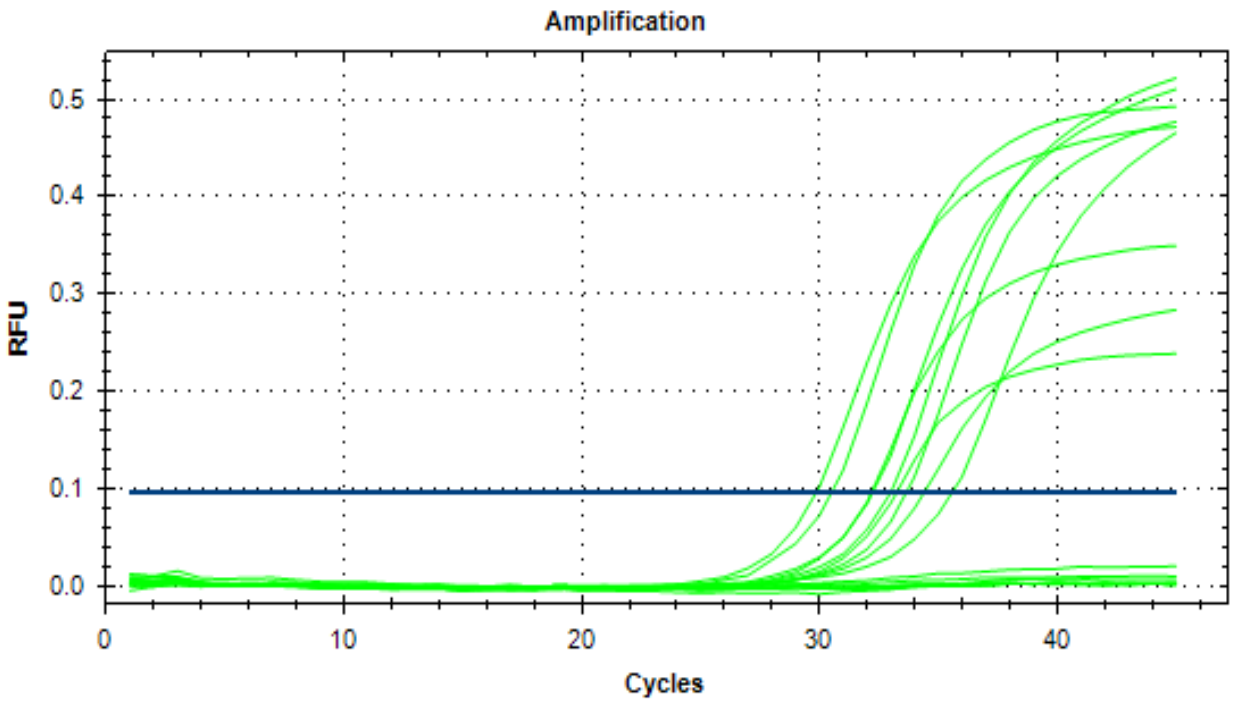
4-6-2 عوامل الضراوة في النوع *E. dispar*

اثبتت الدراسة الحالية امتلاك الطفيلي *E. dispar* لعوامل الضراوة الثلاث قيد الدراسة باستخدام تقنية Real Time PCR باستخدام البادئات الخاصة بجينات العوامل حيث ثبت وجود العامل cysteine proteinase1 في 13عينة من اصل 20عينة ذات اصابة مفردة للنوع ، اي بنسبة 65% والشكل (4-7) يوضح منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR للنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة Cysteine proteinase1:



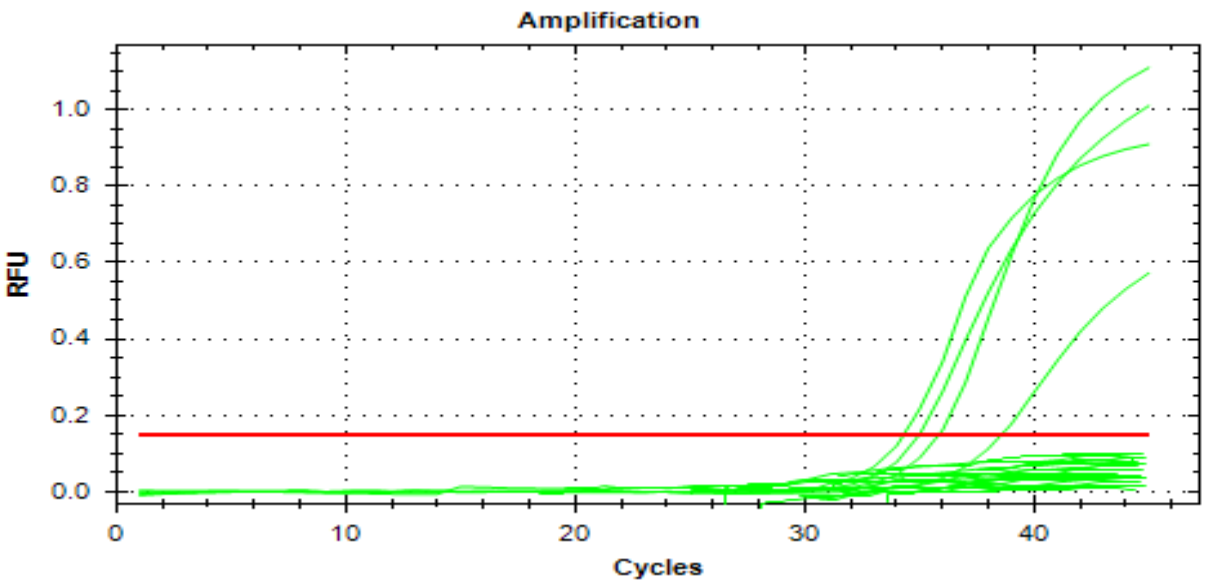
الشكل (4-7): يوضح منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR للنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة ١Cysteine proteinase في النوع *E. dispar* .

كما اثبتت النتـــائج وجود الجين لعـــامل الضراوة Amebopore A في طفيلي *E. dispar* من خلال وجود جين عامل الضراوة في 9عينات من اصل 20عينة أي بنسبة 45% ، والشكل(4-8) يوضح منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR لنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة (amoebapore A) :



الشكل (4-8): منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR للنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة amoebapore A في النوع *E. dispar*

في حين ثبت وجود الجين لعـــامل الضراوة Gal/ Gal Nac lactin في 4عينات فقط من اصل 20 ذات اصابة مفردة بالنوع *E. dispar* اي بنسبة 20%، والشكل (4-9) يوضح منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR للنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة Gal/ Gal Nac lactin:



الشكل (4-9): منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR للنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة (lactin) في النوع *E. dispar*

ويبدو واضحا امتلاك الطفيلي *E.dispar* لعوامل الضراوة الثلاث قيد الدراسة كما سجلت اعلى نسبة لعزل جين العامل cystiene protease1 وكانت 65 % في حين كانت نسبة وجود جينA Amebopore 45% اما جين عامل Gal/ Gal Nac lactin فكانت نسبته الاقل وتساوي 20% ، وقد اظهرت النتائج الاحصائية وجود فروق معنوي بين نسب عزل الجينات الثلاث قيد الدراسة تحت مستوى احتمالية (0.05)، وكما في الجدول التالي:

الجدول (4-5) نسب وجود عوامل الضراوة في طفيلي *E. dispar*

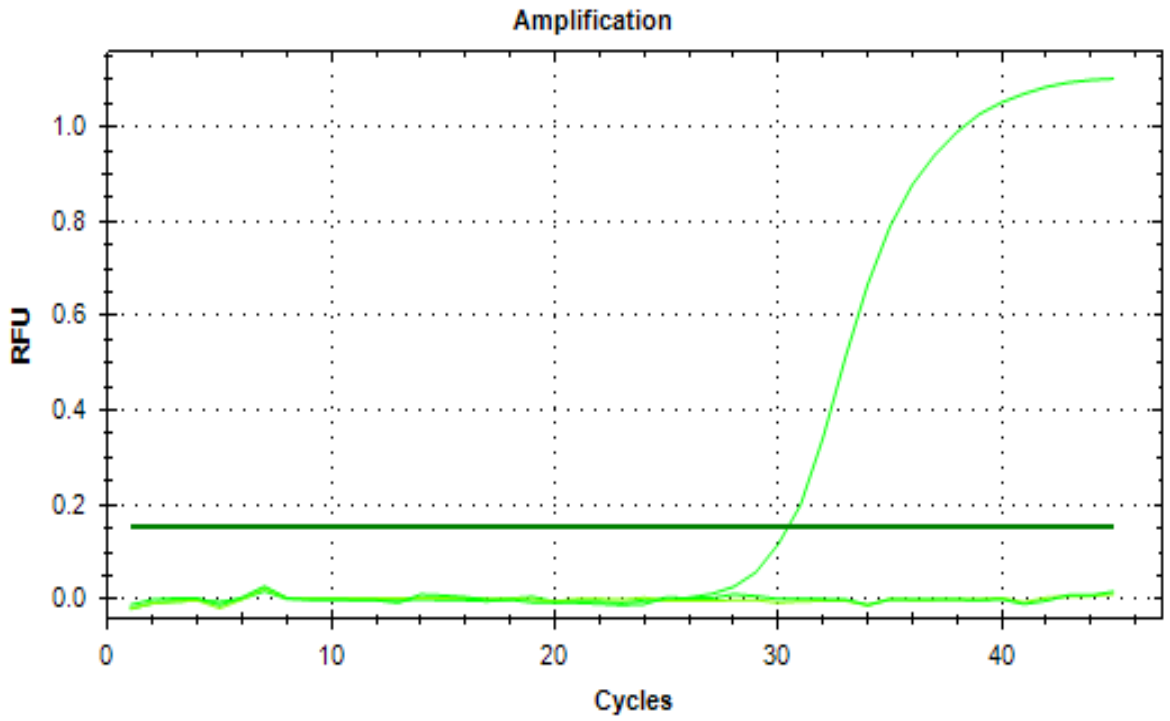
من مجموع 20عينة

عامل الضراوة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية
Cystiene protease 1	13	%65a
Amebopore A	9	%45 b
Gal/ Gal Nac lactin	4	%20 c

*تشير الحروف المختلفة الى وجود الفروق المهمة احصائيا تحت مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$)٠

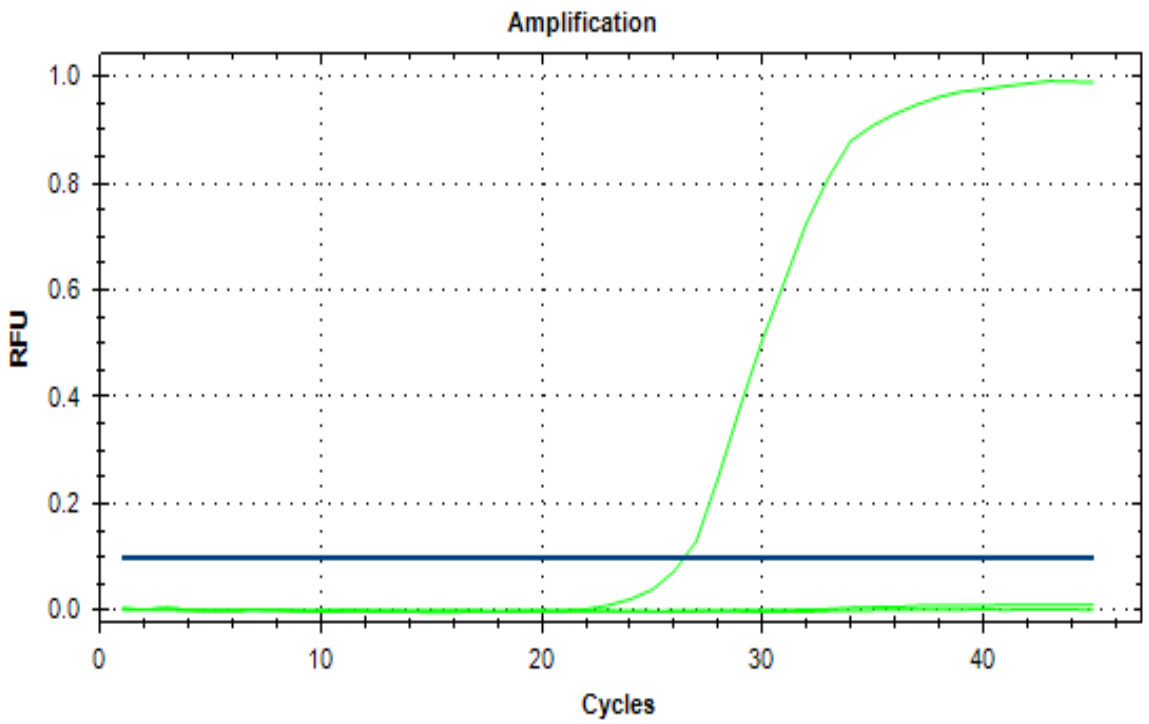
4-6-3 عوامل الضراوة في النوع *E. moshkoviskii*

اثبتت الدراسة الحالية امتلاك الطفيلي *E. moshkoviskii* وجود عامل الضراوة cysteine proteinase 1 بواقع عينة واحدة من اصل العينات الثلاث ذات الاصابة المفردة بهذا الطفيلي اي بنسبة بلغت 3.33% والشكل (4-10) يوضح منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR لنتائج جين عامل الضراوة (Cysteine protease1) :



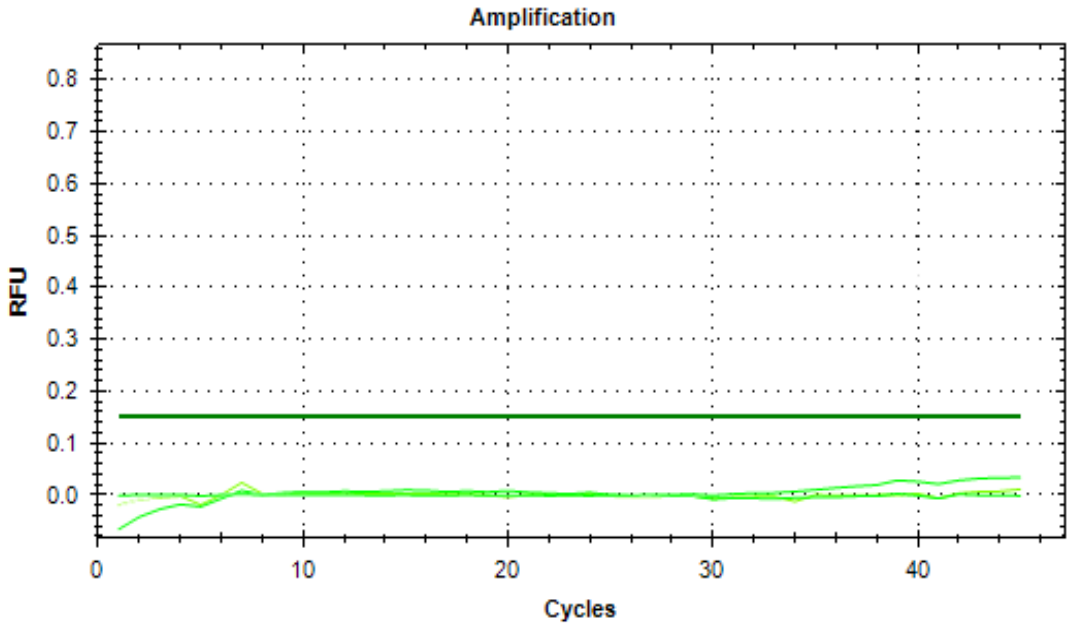
الشكل (4-10): منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR النتائج وجود جين عامل الضراوة Cysteine proteinase1 في النوع *E. moshkovskii*.

في حين اثبتت النتـــائج وجود الجين لعـــامل الضراوة Amebopore A في طفيلي *E.moshkoviskii* بواقع عينة واحدة من اصل ثلاث عينات اي بنسبة 33.3% ، والشكـــل (4-11) يوضح منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR لنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة (amoebapore A) :



الشكل (4-11): منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR للنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة (amoebapore A) في النوع *E moshkovskii* .

كما اثبتت النتـــائج عدم وجود جين عـــامل الضراوة Gal/lactin في طفيلي *E.moshkoviskii* في اصل العينات الثلاث اي بنسبة 0.00% ، والشكل (4-12) يوضح منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCR للنتائج الموجبة لجين عامل الضراوة :



الشكل (4-12):منحنى التضخم Amplification plot لفحص ال Real-Time PCRللنتائج السالبة لجين عامل الضراوة (Gal/ Gal Nac lactin) في *Entamoeba moshkoviskii*

وقد أظهرت نتائج عزل جين العامل cystiene protease وجود هذا العامل في حـين كانت نسبة مساوية لنسبة وجود جـــين Amebopore A 33.3% اما جيــن عامل Lactin فلم يسجل له وجود ضمن العينات المفحوصة، وقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي ظهور فرق معنوي بين نسب عزل الجينات تحت مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ ، وكما هو في الجــدول التالي (4-6) :

الجدول (4-6) نسب وجود عوامل الضراوة في طفيلي *E. moshkoviskii*

من مجموع 3 عينة

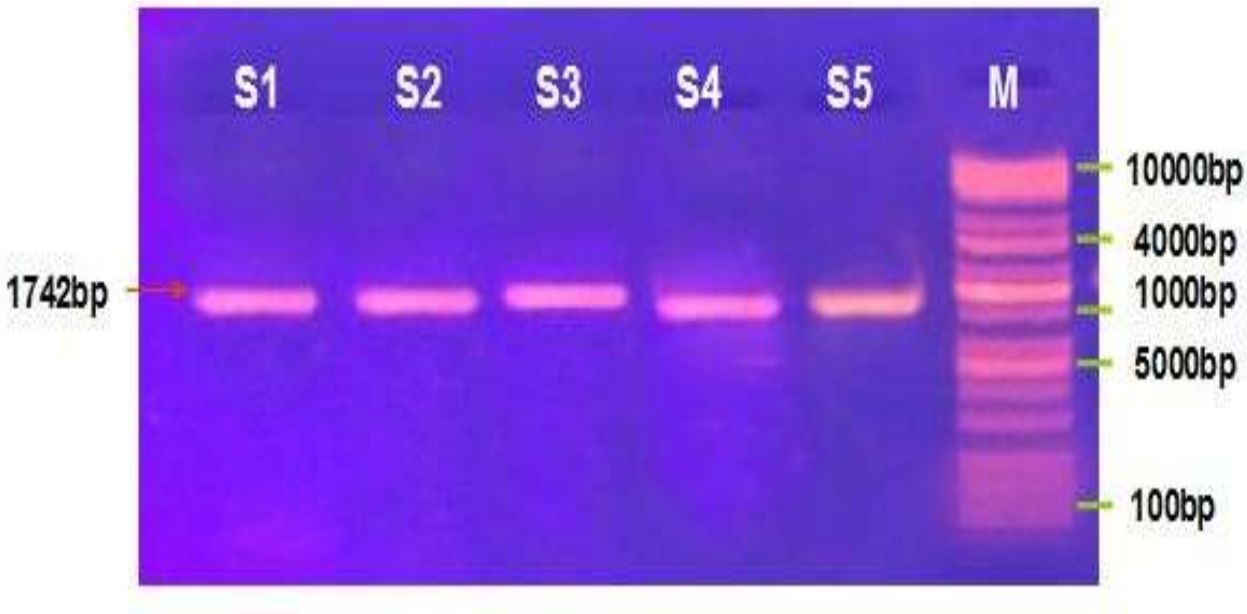
عامل الضراوة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية
Cystiene proteinase1	1	%3.33a
Amebopore A	1	%33.3a
Lactin	٠	%0.00 b

*تشير الحروف المختلفة الى وجود الفروق المهمة احصائيا تحت مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$)

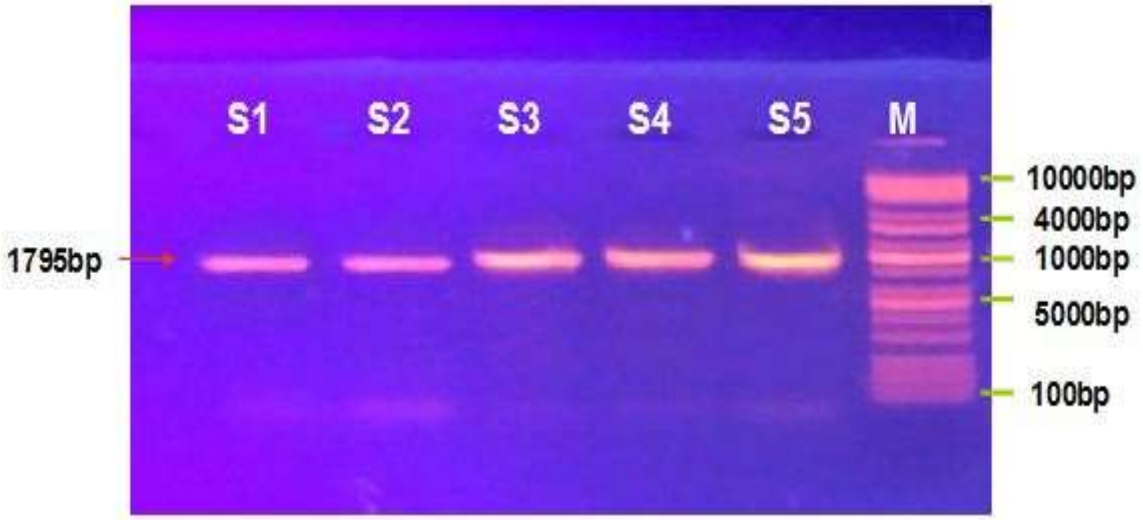
4-7: طريقة DNA sequencer

4-7-1: تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة التقليدي Polymerase chain reaction (PCR)

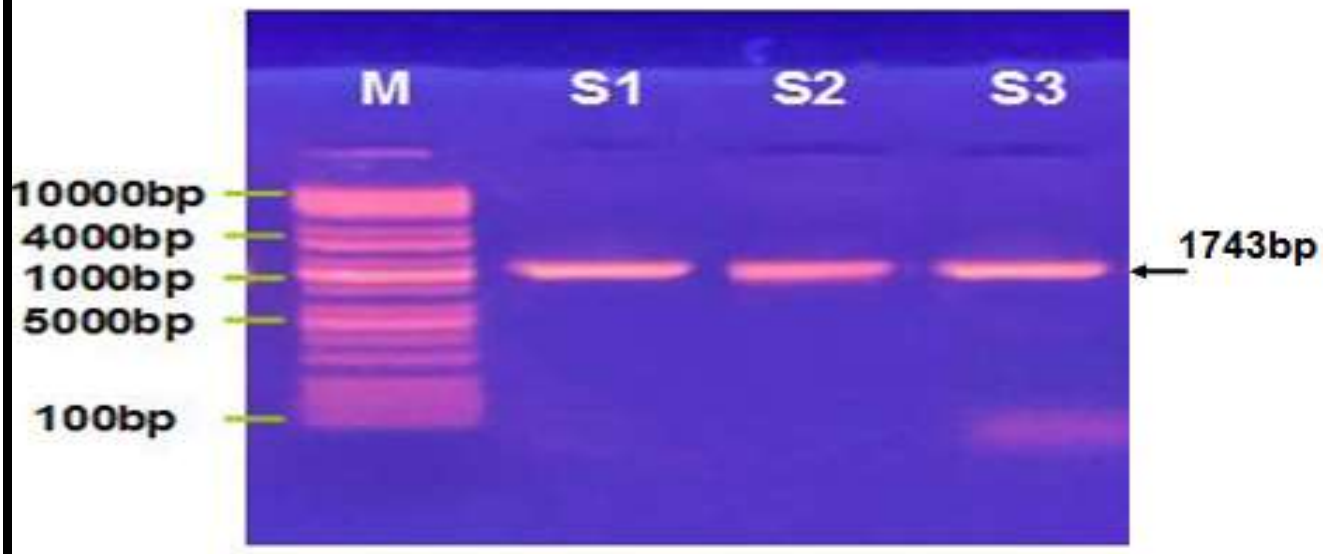
اظهرت الدراسة الجزيئية بأستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي PCR امتـلاك جمـيع عزلات *E. dispar, E. moshkoviskii* *E. histolytica* (13عزلة بواقع 5عزلات للنوعين *E. histolytica* *E. dispar* وثلاث عزلات للنوع *E. moshkoviskii*) المرحلة كهربائيا على هلام الأگاروز لمورثة 18S ribosomal RNA التي تُمثّل الموروث التشخيصيّ للأنواع الثلاث بالحجم الجزيئي (1742 bp) زوج قاعدي Base pair (bp) للنوع *E. histolytica* وكما هو موضح بالشكل (4-13)، والحجم الجزيئي (1795 bp) للنوع *E. dispar* كما في الشكل (4-14)، والحجم الجزيئي (1743 pb) للنوع *E. moshkoviski*i كما موضح بالشكل (4-15) ، مما يُثبت عـــــــائدية جميع العزلات الى الانواع المشخصة فعليا.



الشكل (4-13):الترحيل الكهربائي لهلام الاكروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين 18S rRNA gene الخاص بتشخيص طفيلي *E.histolytica* حيث يمثل M: Marker ladder 10000-100bp و رقم S1-S5 تمثل بعض العينات الموجبة للفحص للجين 18S rRNA gene بناتج 1742bp.



الشكل (4-14):الترحيل الكهربائي لهلام الاكروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين 18S rRNA gene الخاص بتشخيص طفيلي *E.dispar* حيث يمثل M: Marker ladder 10000-100bp و رقم S1-S5 تمثل بعض العينات الموجبة للفحص للجين 18S rRNA gene بناتج 1795bp.



الشكل رقم (4-15):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.

4-6-2 تحليل الشجرة التطورية لأنواع جنس *Entamoeba* قيد الدراسة

باستخدام برنامج (MEGA6) وبالاعتماد على ناتج فحص PCR التقليدي للجين 18s rRNA لأنواع الاميبا فبالنسبة للنوع *E. histolytica* اثبتت النتائج ان التشابه واضح لاصطفاف القواعد النتروجينية مع العزلات العالمية التي تحمل الأرقام التسلسلية DQ286374.1, DQ2863673, DQ286371.1, AF149906, AB608092.1, FR686376.1, Z49256.1 والشكل (٤-١٦) يمثل تحليل متعددة اصطفاف تسلسل القواعد الجينية في حين يمثل الشكل (٤-١٧) تحليل الشجرة الوراثية للمقارنة بين الانواع، اما بالنسبة للنوع *E. dispar* اثبتت النتائج ان التشابه واضح لاصطفاف القواعد النتروجينية مع نفس العزلات العالمية التي تحمل الأرقام التسلسلية المذكورة مسبقا والشكل (٤-١٨) يمثل تحليل متعددة اصطفاف تسلسل القواعد الجينية في حين يمثل الشكل (٤-١٩) تحليل الشجرة الوراثية للمقارنة بين الانواع.

اثبتت النتائج ان التشابه واضح لاصطفاف القواعد النتروجينية للنوع *E. moshkoviskii* مع نفس العزلات العالمية التي تحمل الأرقام التسلسلية المذكورة مسبقا والشكل (٤-٢٠) يمثل تحليل متعددة اصطفاف تسلسل القواعد الجينية في حين يمثل الشكل (٤-٢١) تحليل الشجرة الوراثية للمقارنة بين الانواع :

وبما أنه لا وجود لدراسات سابقة في العراق حول تحليل تتابع القواعد النيتروجينية لعزلات الأنواع *E. histolytica* *E. dispar* *E. moshkovskii* فقد قمنا بتسجيل العينات التي خضعت للتوصيف

الجزيئي التأكيدي في قاعدة البيانات في المركز الوطني للمعلومات NCBI الخاص ببنك الجينات وتم الحصول على الأرقام التسلسلية الموضحة في الجدول (4-7) :

الجدول (4 - 7) الأرقام التسلسلية .Accession NO للعزلات قيد الدراسة في المركز الوطني للمعلومات NCPI

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

5- المناقشة

5-1 – نسبة الاصابة بطفيلي الاميبا باستخدام الفحص المجهري:-

سجلــت الدراسة الحاليــة نسبة اصابة بطفــيلي الأمــيبا بلغت 61.26 % عند فحص 679 عينة غائط لمرضى مصابين بحالات إسهال واضطرابات معوية بطريقة المسحة المباشرة الرطــبة وطريقة المسحة لمحلول اليــود اللوكالي وهذه النسبة مشابــهة تقـريبا لما سجلة الاسدي (2007) حيث كانت في مدينة البصرة 65% ومشابهة نوعا ما لما سجلة نايف وآخرون (2011) في مدينة بغداد عند فحصهم 800 عينه براز للمرضى المراجعين لمستشفى مدينة الطب في بغداد 53.18% في حين سجلت هذه الدراسة نسبة اصابة اعلى مما سجلته السلامي (2005) في محافظة الديــوانية 24.57% ,ومما سجــله هادي (2005) في دراسته أذ سجل نســـبة 31% في الاطفال المصابـــين بطفــيلي الاميـــبا في بغــداد الرصافة, و(2007).AL_shaheen *etal* في محافظة البصرة 29.2% , وكذلك المرشدي(2007)عند فحص عينات للمرضى المراجعين لمستشفى مرجان التخصصي للأمراض الباطنية والقلبية في مدينة الحلة في بابل أذ سجل نسبة اصابة بطفيلي الاميبا بلغت 27.9% ,ودراسة فتوحي وآخرون (2008) أذ بلغت نسبة الاصابة بالطفيلي في دراستهم للأطفال المراجعين لمستشفى ابن الأثير في محافظة نينوى 36.10% وناصر (2010) في محافظة تكريت بنسبة اصابة بلغت 17.5% في حين سجلت (Al-masoudi, 2009) في دراستها للمرضى المراجعين لمستشفى الاسكندرية في محافظة بابل نسبة اصابة بلغت 34.3% ،وكذلك العبودي (2010) لدى المرضى المصابين المراجعين للمراكز الصحية في ناحيتي الغراف والبطحاء التابعة لمحافظة ذي قار من نسبة اصابة بالطفيلي قيد الدراسة بلغت 24.9% .

كما كانت اعلى مما سجله Jasim and AL_Mugdadi(2011) عند تحريه عن الطفيلي في الاطفال المراجعـــين لمستشفى ابن البلدي في بغداد أذ بلغت النسبة في دراستهما 17.3% ,و Hamad and Ramzy (2012) عند دراسته لوبائـــية طفيلي الاميبا الحالة بيـــن الاطفال في اربيـل في إقليم كردســـتان أذ سجل نسبة 30% , ومما سجـله Ibrahim (2012) عند فحصه لعينات الغائط لأطـــفال مراجعين لمستـــشفى الكاظــمية في بغـــداد حيث ســجل نســبة اصـــابة بلغت 9.8% , وفي محافظة القادســـية سجلت (Al-Ibrahimi, 2013) نســبة اصابة بالطـــفيلي بلغت 68% في ،و كذلك ما سجله الجنابي والتكريتي (2014) اذ سجلا نسبة اصابة بالطفيلي بلغت 18.72% بين الاطفال المراجعين لمستشفى الطفل المركزي في مدينة بغداد , و Hama & Rahrmo (2014) من نسبة اصابة

بلغت 2.33% لدى طلبة المدارس الابتدائية في محافظة اربيل, وايضا AL_Shalah (2014) في بابل بنسبة اصابة (17.4 %).

وقد يرجع الاختـــلاف في نسبه الإصابة للدراسات الاخرى بالموازنة مع نسبة الاصابة الحالية الى الاختلاف في مستوى الصرف الصحي والنظافة الشخصية والكثافة السكانية , بالإضافة الى اختلاف الموقع الجغرافي , الظروف المناخية , طرق الفحص (الجبوري وآخرون , 2012 ; 2008 , Kurt *etal.*) واختلاف مدة الدراسة واشهر السنة واختلاف الفئات العمرية الخاضعة للدراسة واسلوب المعيشة.

5-2- الدراسة الجزيئية باستخدام تقنية Real time – PCR

5-2-1- النسب الكلية للإصابة :-

سجلت الدراسة الحالية نسب اصابة مختلفة بالنسبة للأنواع الثلاث للطفيلي قيد الدراسة , وقد بلغت أعلى نسبة أصابة للنوع *E.histolytica* 74% تليها نسبة الاصابة بطفيلي *E.dispar* وبلغت 26% ثم نسبة الاصابة بالنوع *E.moshkoviski* التي بلغت 7% وهذا تتفق مع ما سجله AL_Khafaji,(2014) في محافظة الديوانية بتسجيل أعلى نسبة أصابة للنوع *E.histolytica* بلغت 47% ثم للنوع *E.dispar* بنسبة 31% وأخيرا النوع *E.moshkovisikii* بنسبة 19% , في حين لم تتفق مع Abid *et al*. (2012) في تكريت في دراسته من ان اعلى نسبة للإصابة كانت للنوع *E.dispar* بنسبة 83.33% بالإضافة الى نسبة جمع مختلط بطفيلي *E.moshkovisikii + E.dispar* بلغت 1.85% ولم تسجل أي أصابة للنوع *E.histolytica* وكذلك ما سجله AL_Shalah ,(2014) في محافظة بابل باستخدام تقنية ELISA والذي وجد النوع *E.dispar* كان أعلى نسبة اصابة حيث بلغت 87.9% بينما بلغت *E.histolytica* سجل نسبة اصابة بلغت 22% ولم تسجل أي اصابة للنوع *E.moshkovisikii* ,أما من حيث القيمة فقد اتفقت دراستنا الحالية في نسبة الاصابة التي سجلها للنوع *E.histolytica* والتي بلغت 74% مع ما سجله Ngui *et al* .(2012) من نسبة بلغت 75% في ماليزيا , ألا أنها لم تتفق مع دراسات أخرى فقد كانت النسبة الحالية أعلى مما سجله Ali *et al* . (2003) في بنغلادش والتي بلغت 15.6% وما سجله Parija and Kaherinar (2005)في أيران والتي بلغت 1.7% ومع ما سجله Fotedar *et al*.(2007) في سدني في أستراليا من نسبة بلغت 3.4% وما سجله Mojarad *et al*.(2010) في أيران 3.45% ومع ما سجله Kheirandish *et al*.(2011) في ايران حيث لم يسجلوا أي أصابة للنوع *E.histolytica* , كما لم تتفق مع EL-Bakri *et al*. (2013) في الشارقة في الأمارات العربية المتحددة 10% وكذلك

دراسة Abid *et al*.(2012) في تكريت حيث لم يسجلوا اي اصابة وما سجله AL_Khafaji, 2014في الديوانية من نسبة 47% .

أما قيمة نسبة الإصابة للنوع *E.dispar* في دراستنا الحالية والبالغة 26% فقد اتفقت تقريبا مع ما سجله Ngui *et al*.(2012) من نسبة بلغت 30.8% وما سجله AL_Khafaji, (2014) في الديوانية من نسبة بلغت 31% , ألا أن نتائجنا كانت ذات نسبة أقل مما سجله Ali *et al* .,(2003) التي بلـــغت 35.8% وما سجلـــه Fotedar *et al* .(2007) مـــن نسبـــة بـلغت 33.7% وما ســـجله (Mojarad *et al*.(2010بنسبة بلغت 91.37% وما سجله Kheirandish *et al*.(2011) من نسبة بلغت 93.75% , ألا أنها كانت أعلى مما سجله Parija and Kahenar (2005) من نسبة إصابة بلغت 8.8% , من ما سجله EL-Bakri *et al* .,2013 من نسبة بلغت 4.5% .

بلغت نسبة الاصابة النوع *E.moshkovisikii* في هذه الدراسة 7% وقد اتفقت تقريبا مع ما سجله Mojarad *et al*.(2010) من نسبة بلغت 3.45% وما سجله Kheirandish *et al*. (2011) من نسبة بلغت 6.52% وما سجله Ngui *et al*.(2012)من نسبة بلغت 5.8% ألا انها كانت أعلى مما سجله Parija and Kahenar (2005) من نسبـة بلـــغت 2.2% وما سجله(Abid *et al*.(2012 من نســـبة بلغت 1.85% في حين كانت أقل مما سجــله(Ali *et al* . (2003 من نسبة بلغت 21.1% وما سجله(Fotedar *et al* .(2007 من نسبة بلغت 24.7% , وكذلك أقل من مما سجله(AL_Khafaji, (2014 في دراسته من نسبة اصابة بلغت 19%.

قد يعود الاختلاف في نتائج تقنية PCR الى الاختلاف في طرق استخلاص DNA من عينات الغائط وطرق عمل PCR , كما قد تكون كمية الطفيلي الموجودة في عينة الغائط كاملا مهما يقود الى اختلاف النتائج , يضاف الى هذا زمن أجراء الدراسة والموقع الجغرافي لمنطقة الدراسة والكثافة السكانية والمستوى الثقافي والفئة العمرية التي استهدفتها الدراسة .ولم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما ذكر (Clark,1998) حول اعتباره للنوع *E.dispar* بأنه النوع السائد والأكثر شيوعا وأن معدل نسبة الانتشار *(E.dispar + E.histolytica)* يقدر حوالي 10:1 في بعض المناطق , وكذلك مع ما جاء في دراسة Redondo *et al*.(2006) في كالمنجارو في تنزانيا بأن الإصابة بطفيلي *E.dispar* كانت 14.4 مرة أكثر شيوعا من الإصابة بالطفيلي *E.histolytica* , ويعود هذا الاختلاف في نسبة الإصابة الى ان هذه الأنواع المتطفلة تنتشر بشكل غير منتظم من معظم بلدان العالم بسبب اختلاف الظروف البيئية والمناخية والعادات والتقاليد والسلوك بين بلدان العالم ، أما النسبة المنخفضة للإصابة للنوع *E.moshkovisikii* فهي قد تفسر حقيقة ان هذا الطفيلي كان في بادئ الامر حر المعيشة ونادرا مايصيب

الأنسان الأ أنه يشبه في انتشاره طفيلي *E.histolytica* (Tanyuksel *et al*.,2007) ألا أن مصاحبته للنوعين *E.histolytica* و *E.dispar* وبعض نسب الإصابة العالية تقريبا التي ذكرت في دراسات اعلاه مثل 21.1% في بنغلادش 24.7% في سدني أوحت الى اقتراح الأنسان كمضيف حقيقي نهائي لهذا الطفيلي (Ali *et al*.,2003) وهذا هو الهدف الرئيسي لأجراء هذه الدراسة .

5-2-2- نسب الإصابة المفردة لأنواع الاميبا :-

سجلت الدراسة الحالية نسبة أصابة مفردة للأنواع الثلاث قيد الدراسة وقد كانت النسبة الأعلى للنوع *E.histolytica* وبلغت 56% يعقبها النوع *E.dispar* بنسبة إصابة بلغت 10% ثم *E.moshkovisikii* بنسبة 7% وقد اتفقت نتائجنا من حيث أنتشار وسيادة النوع مع دراسته Ngui *et al*.(2012) في ماليزيا اذ بلغت نسب الاصابة المفردة الأعلى للنوع *E.histolytica* وبلغت 63.5% يليها النوع *E.dispar* بنسبة إصابة بلغت 19.2% ثم *E.moshkovisikii* بنسبة أصابة بلغت 5.8% ألا أن هذه الدراسة سجلت نسب إصابة أعلى من دراستـــنا الحاليـــة في حيـــن لم تتـــفق نتائج دراستنا من حيث سيـــادة النوع ذو نسبة الاصابة المفـــردة مع دراسته Parija and Kahenar (2005) في الهند اذ سجلوا السيادة بالنسبة المفردة للنوع *E.dispar* بنسبة 63.2% يليه النوع *E.histolytica* بنسبة 1.47% وهي نسبة مساوية لنسبة اصابة النوع *E.moshkovisikii* 1.47% أيضاً وما سجله Khairnar and Parija ,(2007) من نسبة أصابة مفردة أعلى للنوع *E.dispar* بنسبة 49.5% يليها *E.histolytica* بنسبة 7.4% ثم *E.moshkovisikii* بنسبة 1% وما سجله Mojarad *et al*.(2010) في أيران بأعلى نسبة اصابة مفردة للنوع *E.dispar* بلغت 91.37% تعقبها نسبة إصابة مفردة للنوع *E.histolytica* و *E.moshkovisikii* بنفس النسبة للإصابة المفردة والتي بلغت 3.45% لكلآ النوعين ,وكذلك دراسة AL_Shalah (2004) في العراق أيضا لأنها تتفق مع هذه الدراسات من حيث سيادة *E.dispar* .

أما من حيث قيمة نسبة الإصابة فقد كانت نسبة الإصابة المفردة للنوع *E.histolytica* بنسبة 56% وهي أقل مما سجله Ngui *et al*.(2012) في ماليزيا بنسبة 65% ألا أنها كانت أعلى مما سجله كل من Parija and Kahenar (2005) بنسبة 1.47% في الهند وأعلى مما سجله Mojarad *et al*.( ) 2010 في أيران بنسبة 3.45% في حين لم يسجل Ayed *et al*. (2008) في تونس و Abid *et al*.(2012) في تكريت اي اصابة للنوع *E.histolytica* أما قيمته نسبة الاصابة المفردة للنوع *E.dispar* والتي بلغت في دراستنا الحالي 10% فتعتبر هي النسبة الأقل بالموازنة مع نسب الإصابة المفـردة لنفس النوع في جميع الدراسات المذكورة أعلاه .

في حين سجلت الدراسة الحالية نسبة اصابة مفردة للنوع *E.moshkovisikii* بلغت 7% وهي أكبر مما سجله Parija and Kahenar (2005) في الهند بنسبة مفرده بلغت 1.47% وكذلك Khairnar and Parija ,(2007) في الهند بنسبة 1% وما سجله Mojarad *et al*.(2010)في أيران بنسبة قد بلغــت 3.45% وكذلك مع ما سجله Ngui et al. (2012) من نسبة بلغت 5.8% , كما سجلت نتائج هذه الدراسة نسبة اصابة أقل مما سجله Ayed *et al*. (2008) في دراستهم أذ بلغت النسبة 7.4% وما سجل AL_Khafaji,(2014) من نسبة بلغت 19% ألا أنها كانت أعلى مما سجل Abid *et al*.(2012) في دراستهم أذ لم يسجلوا أصابة مفردة للنوع *E.moshkovisikii* مطلقا ويلاحظ تباين النسب من الدراسة الى أخرى أذ تشير الدراسات الى أن هناك العديد من العوامل التي تؤثر على أنتشار الطفيلي مثال على هذه العوامل ((وجود الحيوانات واختلاط الأنسان بها والعوامل البيئية كالمناخ ومصادر المياه والازدحام والنقل)) (Chunge *et al*.,1992) .

5-2-3- نسب الإصابة المختلطة للأنواع قيد الدراسة:-

سجلت الدراسة الحالية نسب اصابة مختلفة لأنواع جنس *Entamoeba* قيد الدراسة وكانت أعلى نسبة للنوعين *(E.histolytica + E.dispar)* وقد بلغت 14% وهي تتفق تقريبا مع ما سجله (Ngui *et al*. (2012 في دراستهم من نسبة بلغت 11.5% , ألا أنها كانت أعلى مما سجله Parija and Kahenar (2005) من نسبة أصابة مختلطة بلغت 10.2% ومما سجله (Fotedar *et al* .(2007 حيث سجلوا الإصابة المختلطة بالنوعين في عينة واحدة فقط من أصل 110 عينة , وماسجله (El-Bakri *et al* .(2013 من نسبة 3.3% كما لم تتفق مع دراسات أخرى سجلت نسبة أصابة للأنواع الثلاث الا أنها لم تسجل أي اصابة مختلطة للنوعين *(E.histolytica + E.dispar)* مثل دراسة(Mojarad *et al*.(2010 كما انها لم تتفق مع ما سجله Khairnar and Parija ,(2007) اللذان سجلا في دراستهما النسبة الأعلى والتي بلغت 18.8% , كما سجلت هذه الدراسة نسبة أصابة مختلطة للنوعين *(E.histolytica + E.moshkovisikii)* بلغت 4% وهي كانت أعلى مما سجله Khairnar and Parija ,(2007) من نسبة بلغت 1% في حين لم تسجل الدراسات الأخرى المذكورة أعلاه أي نسبة اصابة مختلطة لهذين النوعين ,وقد سجلت دراستنا اصابة مختلطة للنوعين *(E.moshkovisikii + E.dispar)* بنســبة 2% وهذه النسبة تتفـــق تقريبا مع ما سجل في ايران من قبل Mojarad *et al*.,2010 في دراستهم بنسبة 1.73% وكذلك ما سجله Abid *et al*.,(2012) من نسبة بلغت 1.85% , ألا انها كانت أعلى مما سجل AL_Khafaji,(2014) والتي بلغت 0.5% وما سجل El-Bakri *et al* 2013., في الشارقة من نسبة بلغت 0.8% , كما لم تتفق أيضا مع دراسات اخرى سجلت نسب اصابة أعلى كما في دراسة Parija and Kahenar (2005) حيث بلغت النسبة 16,2 ودراسة Fotedar *et al*

2007., التي سجلت نسبة اصابة بلغت 36% وكذلك Khairnar and Parija ,(2007) التي سجلت نسبة بلغت 8.9%.ولم تسجل الدراسة الحالية اصابة مختلطة للأنواع الثلاثة واتفقت بذلك مع Ali *et al*., (2003) ودراسة Fotedar *et al* 2007., ودراسة Mojarad *et al*.,2010 و AL_Khafaji,(2014) في حين لم تتفق مع Parija and Kahenar (2005) التي سجلت نسبة بلغت 7.3% وما سجله Khairnar and Parija ,(2007) حيث سجلا نسبة اصابة مختلطة للأنواع الثلاث بلغت 7.4% وما سجله El-Bakri *et al* .,2013 من نسبة بلغت 19.2% تعبر الإصابة المختلطة في العينة الواحدة عن تشابه الطرق التي تؤدي الى أصابة المضيف بالمسببات والتي تمثل الاميبا المعوية (John & Petri, 2006) , ويعتبر التشابه الشكلي والاصابة المختلطة من خلال اختبارها لنفس المضيف وتشابه دورات الحياة السبب الرئيسي في تأخير تميز الأنواع حتى توفرت التقنيات الجزيئية عالية الدقة .

3-5 التحري عن عوامل الضراوة

هناك العديد من عوامل الضراوة التي يمتلكها الطفيلي *Entamoeba* مسوؤل عن غزو الأنسجة , وقد استهدفت الدراسة الحالية بعض هذه العوامل بهدف تشخيص عوامل الضراوة لكل نوع لإعطاء فرصته للتحقق من قدرة الأنواع على أحداث الامراضية وأول العوامل التي يتم التحري عنها هو Cysteine Protenase في الأنواع قيد الدراسة بسبب أهميته ودوره الكبير في أحداث الامراضية وأنه من الأنزيمات الضــرورية لأداء الدور الممرض وهو العامل الممرض الأهم Zhang *et al*. (2000)والمفتاح لبدأ تحلل الخلية الهدف Que *et al* . (2003) وبأنه العامل الأكثر كمية و أهمية في النوع *E.histolytica* Lee *et al*. (2014) كما تم اختيار العاملين Gal/Gal Nac lactin و A Amebopore للتحري عنهما في الأنواع قيد الدراسة بسبب دورهما الفعال عند اصابته خلايا حية بالنوع المتطفل *E.histolytica* مختبريا خارج الجسم ودوره في تحلل الخلايا وهي عملية معقدة تتطلب في الأساس التماس بين الطفيلي والخلية بالاعتماد على عامل اللكتين Petri *et al*. (1987) وما ذكره Lieppe *et al*. (1991) عند أجرائهم تجارب مشابهة للدراسة التي تسبقها بأن التحلل يعتمد على عامل الضراوة Amebopore,واستنادا الى ما ذكر أعلاه اختيرت عوامل الضراوة قيد الدراسة الحالية وكما يأتي :-

1-3-5 Cysteine Proteinase 1 (CP1):

تم اختيار هذا الجين للتحري عنه في انواع الاميبا الثلاث كونه واحد من الجينات الثلاث (Eh Ehcp5, EhCp2, CP1) التي تشكل في عملها حوالي 90% فعالية جينات أنزيمات Cysteine

Protenase في مزرعة الأطوار المتغذية للنوع *E.histolytica* Bruchhaus *et al.* (1996) وكذلك Que and Reed (2000) عند دراستهما لأنزيمات Custiene Protenase والامراضية لدى الاميبـــا بأنه هناك تــضارب وعدم تطابق للبــيانات حول وجود عامل الضراوة CP1 في النوع *E.dispar* أو عدم وجوده كما هو الحال في دراسة Espinosa _Contellano &Marteinz _Palomo (2000) وبناء على ذلك تم التحري عن الجيني CP1 في أنواع الاميبا باستخدام Real time PCR التي تعتبر الأكثر دقة وحداثة وقد سجلت النتائج بأثبات وجوده في الأنواع الثلاثة للأميبا , اذ ثبت وجوده في (97) عينة من اصل (112) عينة حاوية على اصابه مفردة للنوع *E.histolytica* تم تشخيصها مسبقا باستخدام تقنية Real time PCR _Tagman brobe اي وجود جيني بنسبة (86.6 % في العينات وهذا يتـــفق من حيــث أثبات وجود جين عامل الضراوة ضمن النوع المتطفل مع ما سجله Tannich *et al.* (1992) في دراستهم حول خريطة التتابع وتشفير الجينات لشكلي من أنزيمات CP في السلالة الممرضة للنوع *E.histolytica* .

بالاضافة لما سجله Reed *et al.* (1993) عند دراستهم لعوامل الضراوة في السلالات الممرضة للنوع *E.histolytica* حيث توصلوا الى الية التحلل تعتمد بصورة رئيسية على التغيير الجيني لأربعة أنزيمات CP بضمنها CP1 , كما تتفق مع ما سجله Bruchhaus *et al.* (1996) في دراستهم للنوع *E.histolytica* و *E.dispar* التي استهدفت عدد الجينات CP والتعبير الجيني , وما سجله Gilchrist and Petri (1999) في دراستهما التي اختصت بعوامل الضراوة للنوع *E.histolytica* , وما سجله Davis *et al.* (2007) في دراستهم حول موازنة بين سلالتين من *E.histolytica* ودراسة عوامل الضراوة والتعبير الجيني والعوامل الوراثة للسلالتين , وهذا يدل على أنه ليس جميع سلالات *E.histolytica* تحوي على أنزيمات CP1 المسؤلية عن أحداث وضراوة الامراضية أما بالنسبة للنوع *E.dispar* فقد سجلت الدراسة الحالية وجود جيني عامل الضراوة CP1 في (13) عينة من أصل (20) ذات أصابة مفردة بالنوع *E.dispar* تم تشخيصها مسبقا بتقنية Real time PCR(Tagman brobe) أي بنسبة وجود 65% وهذا يتفق من حيث وجود الجيني مع ما سجله Reed *et al.*,(1993) في في دراستهم حــول أكتشاف تتابع CP1 في سلالات للنوع E.dispar وما سجله Que and reed ,(2000) و Bruchhaus *et al.* (1996) بأن النوع *E.dispar* يشفر أربعة جينات CustieneProtenase مشابه مع *E.histolytica*هي (EdCP1_EdCP4), في حين لم تتفق نتائـــجنا الحالية بالنــسبة للنوع *E. disar* مع ما سجله Bruchhaus and Tannich .(1996) , Gilchrist and Petri(1999) اللذين اشاروا في دراستهم الى عدم ظهور CP1 في النوع *E.dispar* .

كما سجلت نتائج هذه الدراسة وجود الجين CP1 في النوع *E.moshkovisikii* بواقع عينة واحدة من أصل 3 عينات ذات أصابة مفرده بالنوع *E.moshkovisikii* ثم تشخيصها مسبقا بتقنية R.T PCR(Tagman) وهذا يتفق نوعا ما مع ما ذكره Pere2_Tamayo *et al*. (1991) عند دراستهم لدور كريات الدم البيضاء وأنزيمات Protease في الاصابة المختبرية للجرذان بتنخر الأنسجة نتيجة الإصابة بالنوع *E.moshkovisikii* بامتلاك هذا النوع من الاميبا أنزيمات Cystiene Protenase لكن دون تحديد الجين , ودراسة Lopez_Revilla and Baez_Camargo(1992) حول الأنزيمات المحللة للبروتين في الطور المتغذي للنوع *E.invadens* والنوع *E.moshkovisikii* وقد أكدوا امتلاك النوع *E.moshkovisikii* لانزيمات CP دون تحديد نوع الجيني , ومع ماذكره Serrano _Luna *et al*. (2012) حول وجود انزيمات CP في النوع *E.moshkovisikii* كما انه لم يحدد نوع الجيني ألا أننا لم نستطيع الحصول على أي دراسة أو بحث حول تحديد أنواع الجينات CP الموجودة ضمن النوع *E.moshkovisikii* لذا قد يعد هذا التسجيل الاول لوجود جين عامل الضراوة CP1 في النوع *E. moshkoviskii*.ولقد كانت النسبة الأعلى لوجود CP1 في النوع *E.histolytica* 86.6% وهذه نتيجة موفقة نظرا لما هو معروف من قدرة هذا النوع على أحداث المرض , في حين تلاه النوع *E.dispa*r بنسبة وجود بلغت 65% وهذا يتفق مع ما ذكره Reed *et al*. (1993) و Que and Reed (2000) من امتلاك بعض سلالات *E.dispar* للجين CP1 .

كما تتفق مع Shibayama *et al*. (2007) اذ اقترحوا في دراستهم أن سلالات قليلة من *E.dispar* ربما تسبب خراجات كبدية في جرذ الهامستر , ومع ما سجله Dolabella *et al*. (2012) مؤخرا عن قدرة السلالة ICB_ADO على اتلاف خلايا الكبد وتحطيم الخلايا احادية الطبقة في المزرعة بوجود البكتريا المعوية الشائعة , وقد ذكر Cost *et al*.,(2006 بأن التفاعل بين الطور المتغذي للنوع *E.dispar* Dolabella *et al*. (2012)والبكتريا ويعتبر العامل المحدد لقدرة النوع على أحداث المرض , كما ناقش Dolabella *et al*. (2012) حقيقة كون النوع *E.dispar* المتعايش أو الممرض حيث قدموا دليلا على أن البكتريا قادرة على المشاركة في تنظيم عمل عوامل الضراوة مثل Proteanase والتي تعد العامل الأهم للضراوة .

لقد سجلت الدراسة الحالية نسبة وجود CP1 الأقل من النوع *E.moshkovisikii* بقيمة 33.3% وقد يعود السبب الى قلة عدد العينات والتي بلغت (3) عينات فقط واحتمال وجود الطور المتكيس للنوع *E.moshkovisikii* في بعض العينات وليس الطور المتغذي الذي يمتلك الجيني Cp1 ,حيث أكد بعض الباحثين الدور الممرض لهذا النوع من الاميبا كما في دراسة Shimokawa *et al*. (2012) والتي أثبتت قدرة هذا النوع على أن يسبب إسهال وفقدان وزن والتهاب قولون عند أصابته للإنسان في حين أكد

Serrano _Luna *et al*. (2012) في دراستهم حدوث ألتهاب وتنخر في أنسجة الفئران عند حقنها بالطور المتغذي للنوع *E.moshkovisik*ii وذكروا أن سبب هذا يعود الى فعالية انزيمات protenase التي تمتلكها نوع الاميبا، من الجدير بالذكر ان اختلاف درجة الامراضية بين النوعين *E.histolytica* و *E.dispar* يرجع الى أن التعبير الجيني للأنزيمات CP يكون عالي الفعالية في النوع *E.histolytica* في حين يكون أقل فعالية في النوع *E.dispar* (Bruchhaus *et al*. _ Bruchhaus *et al*.,(1996)) (2003) ولم يثبت لحد الان بأن إمراضيه النوع *E.histolytica* يرجع الى امتلاكه أنواع أكثر من جينات CP أو الى فعالية هذه الجينات في التعبير الجيني Que *et al*. (2002) ويبدو بأن الحال نفسه للنوع *E.moshkovisikii*.

وبما أن هذه الدراسة أثبتت وجود الجين CP1 في الانواع الثلاثة المعنية فأن هذه النتيجة لا تتفق مع الدراسات والبحوث التي تستند على أساس استخدام عامل الضراوة CP1 للتحري عن وجـــود أحد أنواع الاميبا قيد الدراسة في عينات الغائط بسبب توقع الإصابة بالأنواع الأخرى في نفس العينة وكما هو الحال في دراسة Melandez-lopez (2007) حول تشخيص الاميبا الحالة بالتشخيص الجزيئي بالاعتماد على جينات عامل الضراوة CP1 ، وكذلك دراسة (Hussien and Hamady, 2014) حول التحري عن عوامل الضراوة CP1 ,CP5 لتشخيص الاميبا الحالة للنسيج في محافظة النجف الأشرف بتقنية التفاعل التسلسلي لأنزيم البلمرة اذ تم فحص 162عينة موجية الفحص المجهري للنوع *E.histolytica* بتقنية Real time PCR للتحري عن النوع نفسه باستخدام بادئات نوعية تختص بجينات عوامل الضراوة CP5, CP1 لكن بما أن العامل CP1 ثبت وجوده في أنواع الاميبا الثلاث *E.dispar* , *E.histolytica* *E.moshkovisik*ii فلا يمكن الاعتماد على وجود الجيني لتشخيص نوع واحد بسبب احتمال الإصابة المختلطة للأنواع .

Amebopore-2-3-5

هو من عوامل الضراوة المعروفة للنوع *E.histolytica* وقد اقترح الباحث Bracha *et al*.(2003) أن هذا البروتين يلعب دور المفتاح لبدء عملية التحلل للخلايا الهدف , وقد استهدفت الراسة الحالية في أحد جوانبها التحري عن الجيني Amebopore A في الأنواع قيد الدراسة وسجلت وجوده في النوع *E.histolytica* بواقع (90 عينة من أصل 112 أي بنسبة بلغت 80.35% وهذه النتيجة تتفق من حيث وجود الجيني مع ما ذكره Sehgal *et al*. (1996) في دراستهم حول إمراضيه النوع *E.histolytica* اذ عرفوا هذا العامل بأنه بروتيني قادر على اختراق الطبقات الثنائية الدهنية للخلية الهدف وتكوين قنوات أيونية ,كما ذكر Bracha *et al*.(2002) في دراستهم من خلال اجراء بعض التجارب التي استهدفت

التنشيط للجين Amebopore A للكشف عن أهمية دوره كعامل ضراوة للنوع الممرض في الطور المتغذي *E.histolytica* وقد أثبتوا بأن حدوث أي تغيير في كمية من هذا البروتين أو في موقعه الخلوي أو تنظيمه يقود الى حدوث تغيرات واضحة في الأداء الممرض للنوع، كما أثبت (Bracha *et al*.) (2002 في تجاربهم التي استهدفت الجين Amebopore A في النوع *E.histolytica* من السلالة الممرضة (HM-1:IMSS) وذلك بأحداث طفرات في الجين Amebopore A باستخدام البلازميدات في الطور المتغذي للنوع وقد أظهرت النتائج أن الاطوار المتغذية التي فقدت AP-A اصبحت غير ممرضه ولها قدرة ضعيفة على تحليل البكتريا ، بالإضافة الى هذا فقد ذكر Oyibo *et al*. (2007) بأن عمل Amebopore A يتضمن قتل الخلية الهدف وان دراسة وظيفته ودوره في الامراضية يعتبر أفضل مثال نموذجي لدراسة ميكانيكة قتل الخلايا المستهدفة من النوع الممرض، كما سجلت الدراسة الحالية وجود جين الضراوة Amebopore A في النوع *Entamoeba dispar* في 9 عينات من أصل 20 عينه أي بنسبة بلغت 45% وهدا يتفق من حيث وجود الجيني مع ما ذكره Lieppe *et al*. (1993) في دراستهم من وجود الجين AP-A في النوع *E.dispar* مشابه لما موجود في النوع *E.histolytica* ألا أنه أقل فعالية من نســبة 60% كما أثــبت Sehgal *et al*. (1996) وجود هذا العامل في النوع *E.dispar* وأن فعاليته تصل الى النصف تقريبا بالموازنة مع النوع *E.histolytica* , كما ذكروا أن والوظيفة الطبيعية لهذا العامل قد تكون تحطيم البكتريا المهضومة , كما تتفق مع Kayser *et al*. (2005) الذين ذكروا في دراستهم أن النوع *E.dispar* ينتج كميات من AP-A وكذلك Campos-olivos-Gracia *et al*., و (rodrigus & Jarillo – Luna(2005)

(2009) وقد بينت النتائج امتلاك النوع *E.moshkoviskii* للجيني AP-A وبواقع عينة واحدة من أصل 3 عينات أي بنسبة 33.3% ولم نتمكن من أيجاد دراسة حول وجود هذا الجيني ضمن النوع ألا أنه قد يكون دور هذا العامل يختص بتحطيم البكتريا المهضومة واستعمالها كغذاء للأميبا (Haque *et al*.,2003) أو قد يكون له دور تحللي ففي دراسة قام بها Shimokawa *et al*. (2012) أثبت أن النوع *E.moshkoviskii* له القدرة على تحليل كريات الدم الحمراء للجرذان كنموذج عن الثديات في حين كانت كريات الدم الحمراء للإنسان مقاومة بشدة للتحلل ولم تحظ عوامل الضراوة بالاهتمام والدراسة في النوع *E.moshkoviskii* مما تنتج عنه صعوبة في مناقشة كنتائج الخاصة به ومقارنتها مع الدراسات الاخرى .

لا نتفق في دراستنا الحالية مع الدراسات الحالية التي تعتمد في التشخيص الجزيئي للأنواع على أساس وجود عوامل الضراوة لأن هذه العوامل قد لا تكون مشخصة في بعض الانواع الاخرى التابعة لنفس الجنس أو قد تكون موجوده الا أنها غير فعالة بعملها الامراضي مما تنتج عنه خطأ في نتائج الفحص , ولهذا السبب فلا تتفق مع (AL-Hameedawi ,2014) في دراسة حول التشخيص الجزيئي للنوع

E.histolytica باستخدام المورثين (Actin),(Amebopore A) في عينات البراز باستخدام تقنية التفاعل التسلسلي لأنزيم البلمرة Real time PCR والتي أعطت نتيجة وجود النوع *E.histolytica* في (25 عينة براز من أصل (104 عينة أي بنسبة 24% في حين أثبتت نتائج الدراسة أن استخدام نفس تقنية التشخيص الجزيئي وجود الجين Amebopore A في الانواع الثلاث قيد الدراسة . في حين اتفقت نتائجنا مع ما ذكره Campos-Rodriguezp and Jarillo-Luna(2005) عند دراستهما امراضيه النوع *E.histolytica* وارتباطها بقدرتها على تجنب المناعة وأن كلا من النوعين *E.dispar* و *E.histolytica*يمتلك عامل الضراوة Amebopore A .

5-3-3-/ Galactose N-acetyle-D-galactosamine اللكتين

هو عامل الالتصاق السطحي للأطوار المتغذية , كما أنه يشارك في عملية تحفيز التحلل الخلوي اذ أن حدوث الالتصاق بين الطور المتغذي و والخلية الهدف يحفز الطور المتغذي على إفراز انزيمات Cystiene Protanse, Amebopore (1999).Barcha *et al*, (2001).Hellberg *et al* وقد يساهم هذا العامل في عملية استقرار الاميبا على طبقة Protoglycan أثناء عملية الغزو (Tanyuksel and Petri ,2003) وقد سجلت الدراسة الحالية وجود الجيني المسؤول عن هذا العامل في النوع *E.histolytica* بواقع (84 عينة من أصل (112) عينة أي بنسبة بلغت 75% وهذا يتفق مع ما سجلته (Al-Ibrahimi,2013) خلال دراستها التي اثبتت وجود هذا العامل في 55 عينة من اصل 62 عينة موجبة الفحص المجهري للنوع *E. histolytica* اي بنسبة (89%).

وقد اثبت (1987).Petri *et al* و (1981).Ravidin *et al* في دراستهم وجود الجين لهذا العامل في النوع *E.histolytica* وذكروا ان الهدف من قتل الخلية الهدف يعتمد على التصاق الطفيلي بالخلية نظرا لامتلاكه الجيني المسؤول عن تشفير Gal\Gal Nac Lectin في حين ذكر Cuerrant *et al* (1981). أن الخطوة الجوهرية لقتل الخلية الهدف يعتمد على امتلاك النوع المتطفل لعامل الالتصاق وقد أشار Boettner *et al*. (2002) بأنه على الرغم من أن Gal\Gal Nac Lectin ليس عامل الضراوة في النوع *E.histolytica* الا انه بالإمكان تعريفه بأنه العامل الأكثر ديناميكية وله دور مؤثر في كل العمليات الخاصة بأحداث الاصابة .

كما أثبت كل من Compos-Rodriguezip and Jarillo-Lung(2005) وجود الجين المســـؤول عن تشــفيرهذا العامل في النوع *E.histolytica* والمبدأ نفسه يتفق مع دراسة Olivos-Garcia *et al*. (2009) بامتلاك النوع الجيني المعني، وقد سجلت الدراسة الحالية وجود هذا الجين في النوع *E.dispar* بواقع 4 عينات من أصل (20) عينه أي بنسبة بلغت 20% وهذا يتفق من حيث وجود

الجيني مع ما سجله Keystone *et al*. (1999) في دراستهم التي استهدفت وبائية النوعين *E.dispar* و *E.histolytica* والمقارنة بين الطرق التشخيصية للتحري عنهما ومن خلال ذلك أثبتوا وجود الجين قيد الدراسة في النوع *E.dispar* وكما أثبت Dellen *et al* (2002) أن كلا النوعين *E.dispar* و *E.histolytica*يشـــفران نفس الجـــين لعامل الالتصاق وهذا ما أكده كل من Compos-Olivos-Garcia *et al*. (2009) Rodriguezip and Jarillo-Lung(2005) وكذلك ما أكده Dolabella *et al*. (2012) عند دراستهم لخراج الكبد الاميبي والتحري عن النوع *E.dispar* في خراج الكبد ووجود الجيني المسؤول عن تشفير عامل الالتصاق المذكور ,في حين لم تسجل نتائجنا أي وجود لهذا العامل في النوع *E.moshkoviskii* رغم أهميته الكبيرة في أحداث الامراضية الا ان دراسته Shimokawa *et al*. (2013) حول دراسة المناعة المتخصصة المستحثة بواسطة الاصابة بالنوعين *E.histolytica*و *E.moshkoviskii* في الفئران أثبتت قدرة النوعين على الالتصاق بالخلايا الطلائية للقولون وتكوين المستعمرات وأحداث الاصابة الا أن شدة الاصابة اختلفت لكلا النوعين , كما أن حساسية النوعين لعقار الميترونيدازول المستخدم ضمن التجربة قد أختلف أيضا, ألا ان لكلا النوعين القدرة على توليد استجابة مناعية تحمي الفئران من حدوث أصابة اخرى من قبل الانواع القريبة وراثيا في حالة الاصابة بها مستقبلا , وقد فسروا اختلاف سلوك النوعين في احداث الامراضيه الى اختلاف التتابع الينوكليوتيدي للجيني الذي يشفر البروتين الخاص بالعامل Gal\Gal Nac Lectin الذي يملكه كلا النوعين , عند التحري عن وجود عامل الالتصاق قيد الدراسة في هذا النوع وأن هذه النتيجة سالبة لا تعني عدم وجود عامل الالتصاق بل قد يكون موجودا لكن بتتابع نيوكليتيدي مختلف عن الجيني المستخدم وللتشخيص في الدراسة الحالية كما نأخذ بنظرالاعتبار قلة عدد العينات المفحوصة.

5--4 الاعراض المرضية المصاحبة للإصابة المفردة للأنواع الأميبا المدروسة

تباينت الاعراض المرضية بشكل طفيف لدى المصابين وكما يلي :

5--4-1 الأعراض المرضية المصاحبة للإصابة بالنوع *E. histolytica*

بينت نتائج الدراسة الحالية ظهور الأعراض المرضية وحالات الإسهال والاضطرابات المعوية وفقدان وزن وألم في البطن يتراوح بين المغص الشديد الى حالات أقل شدة وكذلك ارتفاع طفـيف في درجات الحرارة لدى المرضى المصابين بالنوع *E. histolytica* كإصابة مفردة في المرضى الذين بلغ عددهم 112 مريـض من أصل 200 شخص خضعت عيناتهم للتشخـيص الجـزيئي أي بنسبة (56%) وهذا يتفق مع ما سجله (2010) . Hamzah *et al*

من خلال فحصهم 32عينة غائط لأشخاص يعانون من الاضطرابات المعوية سجلوا من أربع عينات فقط اصابة مفردة بالنوع *E. histolytica* , وكذلك EL-sobky *et al* . (2011) في مصر حيث تم فحص عينات غائط (100) شخص مصاب باضطرابات معوية وحالات اسهال ومصابين بداء الأميبـــات المعوي وكانت نســـبة الذين تعرضـــوا للإصابة المفردة حوالي 25 % و(2012) . Ngui *et al* النسبة الأعلى من بين أنواع الأميبا في ماليزيا 75 % من المصابين أصـــابة مفردة بالـــنوع *E. histolytica* . و (AL.- Bakri *et al* ., 2013) في الأمارات العربيـــة المتحـــدة . سجل نسبة اصابة مفردة هي الأعلى وبلغت 10 % أي 12 من 120 عينة .

2-4--5 الاعراض المرضية المصاحبة للإصابة بالنوع *E.dispar*

سجلت الدراسة الحالية ظهور اعراض مرضية تمثلت بالاضطرابات المعوية لدى الاشخاص المصابين بهذا النوع باصابة مفردة بالنوع *E.dispar*، بلغ عددهم 20 شخص فقط من اصل 200 شخص مصاب خضعت عينات الغائط لهم للتشخيص الجزيئي بتقنية R.T –PCR وقد كانوا يعانون من حالات اسهال متكرر اصفر شاحب والم بطني بالإضافة الى ارتفاع طفيف في درجات الحرارة ، وهذا يتفق مع ما سجله (Gonin and Tudel ,2002) من ظهور اعراض مرضية بدأت بحالات اسهال استمر الى حوالي 3 اسابيع مع وجود دم ضئيل وحمى ليوم واحد فقط ومغص في البطن وغثيان و (Pestehchain ,2011) الذي اشار في دراسته الى حدوث حالات اسهال وحمى مغص في المرضى المصابين بالنوع *E.dispar* وعلى الرغم من ان بعض الدراسات اعتبرت النوع *E.dispar* هو المتعايش في الانسان وغير مرضي الا ان دراسات اخرى اثبتت عكس هذا ، واشارت الى قدرة هذا النوع على احداث ضرر في الانسجة

(Espino-contekkano *et al* ,1998)، اذ سجل (cotsa *et al* ,2006) اعراض مرضية لدى المصابين بالنوع *E.dispar* اقتصرت على التهاب القولون بدون اسهال في حين سجل Ximenez *et al* 2010, ظهور اعراض مرضية اكثر خطورة لدى المصابين بهذا النوع وصلت الى حالة خراج الكبد الاميبي .

كما تتفق نتائجنا مع ما سجله (ناصر ،2010) من تكريت من ظهور اعراض مرضية لـ (45) مريض مصاب بالنوع *E.dispar* كإصابة مفردة ومريض واحد مصاب اصابة مختلطة بالنوعين كلاهما (*E.dispar + E.moshkoviskii*) كانوا يعانون من حالات اسهال والام بطنية وقد يعود السبب في اختلاف الاعراض المرضية او الاختلاف في ظهورها من عدم ظهورها ايضا الى حالة جسم المصاب وكفاءة جهاز المناعي وعمر المريض او الى السلالة التي احدثت المرض فقد تختلف القدرة في احداث

الامراضية الى نوع السلالة مما يشير الى ضرورة عدم الجزم بعدم امراضية النوع *E.dispar* وذلك بسبب قدرته على احداث امراضية مختلفة التأثير ومتباينة الموقع.

3-4--5 الاعراض المرضية المصاحبة للإصابة بالنوع *E.moshkoviskii*

سجلت الدراسة الحالية ظهور اعراض مرضية تمثلت بالاضطرابات المعوية لدى الاشخاص المصابين بهذا النوع اصابة مفردة ، حيث اظهرت النتائج ان ثلاث اشخاص فقط من اصل 200 شخص مصاب خضعت عينات الغائط لهم للتشخيص الجزيئي بتقنية R.T – PCR تعرضوا لإصابة مفردة بالنوع *E.moshkoviskii* طفلان احدهما بعمر اثنى عشر سنة وثمان شهور والاخر ذكر بعمر سبع سنوات وامرأة بعمر ٤٢ سنة) وكان جميعهم يعانون من حالات اسهال متوسط ذو قوام مخاطي نوعا ما تراوح لونه بين الاصفر الى البني ، وكذلك يعانون من فقدان في الوزن والم في البطن ، وقد اتفقت نتائجها الحالية مع ما سجله (Ali *et al* , 2003) في دراستهم حول وجود النوع *E.moshkoviskii* في عينات الغائط لاطفال مصابين باضطرابات معوية تراوحت اعمارهم بين (2-5) سنوات في بنغلادش و (Fotedar *et al* ,2007) في تركيا حيث اثبتوا حدوث الاصابة بنفس النوع لمرضى يعانون من الاضطرابات المعوية .

كما اتفقت النتائج مع ما سجله Tankyksel *et al*. (2007) ولتشخيص الاصابة بالنوع *E.moshkoviskii* كإصابة مفردة في حالتين في تركيا من اصل 200 عينة مفحوصة لمصابين يعانون من الاضطرابات المعوية وقد تمثلت هاتين الحالتين (طفلة بعمر 2 سنة وامرأه بعمر 36 سنة) يعانون من حالات الاسهال ، فقدان الوزن ، الاعياء ، اما البراز فكان بلون اصفر شاحب وكذلك فقد اثبت Sukpraset *et al* .(2008) في دراستهم ايضا عزل نفس النوع من عينات الغائط لأشخاص مرضى يعانون من حالات اسهال واضطرابات معوية والم في البطن وما سجله (Mojarad *et al* , 2009) في ايران من اعراض مرضية تمثلت بانتفاخ في البطن والم بطني وغثيان واسهال معتدل او متوسط لدى المرضى المصابين بالنوع *E.moshkoviskii* حيث اظهرت نتائج ظهور الاعراض المرضية في 58 عينة بغائط المرضى يعانون من الاضطرابات المعوية و 2 منها فقط اصابة مفردة بالنوع *E.moshkoviskii* اما العينات 56 البقية فقد كانت بإصابة مختلفة بالأنواع الثلاث للأميبا قيد الدراسة ونظرا لعدم وجود فيروسات في تلك العينتين لذلك فقد اشاروا الى احتمال انه النوع *E.moshkoviskii* هو المسؤول عن ظهور الاعراض المرضية في المرضى المصابين بالنوع نفسه مثل الاسهال والاضطرابات المعوية.

كما سجل Ngui *et al*. (2012) ظهور الاعراض المرضية في المرضى المصابين بالنوع نفسه مثل الاسهال والاضطرابات المعوية المصاحبة له ، وهذا يشير الى وجود علاقة بين ظهور الاعراض

المرضية المرتبطة بالاضطرابات المعوية والاصابة بالأنواع قيد الدراسة ، وحدوث الاصابة بالنوع *E.moshkoviskii* في الانسان يشير الى ان هذا النوع يعد مسببا مرضيا له ويتفق ذلك مع ما ذكره Skupraset *et al*. (2008) في دراستهم حول التحري عن النوع *E.moshkoviskii* في الاشخاص الاصحاء وقد اظهرت نتائجهم عدم وجوده في عينات الغائط المفحوصة للأشخاص الاصحاء في حين اقتصر وجوده في العينات المأخوذة من المرضى الا اننا لم تتفق في نتائجنا مع ما سجله (Ayed *et al*. 2008) في تونس من ظهور النوع *E.moshkoviskii* في عينات غائط الاشخاص اصحاء ذكور لم تظهر عليهم اي اعراض مرضية ، قد يعود السبب في ذلك الى عامل الجـنس كون المصابين ذكـور او الى كفـاءة الجهاز المناعي في حين ان الاعراض الممرضة سجـلت في دراســتنا و دراسة Tanyskel *et al*. (2007) في النساء والاطفال او ان حدوث الامراضية للنوع يرتبط بالفعاليات الفسيولوجية للجسم او الاصابة لحالات مرضية اخرى .

5-5 تحليل القواعد النتروجينية للعينات المعزولة :

تبين من نتائج اصطفاف القواعد النتروجينية وتحليل الشجرة الوراثية للأنواع التي استهدفتها الدراسة الحالية بأنها كانت اقرب وراثيا للعينة التي تحمل الرقم التسلسلي z49256.1 المعبرة عن النوع *E. dispar* والتي سجل وجودها جورجيا من قبل Ovarnstrom *etal*. (2005) وهي مماثلة جينيا للعينات التي سجل وجودها في ايطاليا من قبل Chang *etal*.(2008) و ما سجله Stark *et al*. (2008)في سدني في استراليا و Calderaro *et al*. (2015) في ايطاليا، وكذلك للعينة التي تحمل الرقم التسلسلي AB608092.1 المعبرة عن النوع *E. histolytica* والتي سجل وجودها في طوكيو في اليابان من قبل Suzuki *et al*.(2011) والعينة بالرقم التسلسلي FR686376.1 المسجلة في الدنمارك Stensvold *et al*.(2011) والعزلات DQ286373.1, DQ286371.1 ,DQ286374.1المسجلة في لندن من قبل Clark *et al*.(2006).

إنَّ الغرض من ألـ DNA sequencer هو تأكيد لعزلاتنا للأنواع الثلاث للطفيلي بالإضافة إلى معرفة مع من يكون تشابهها من بين العزلات العالمـــــية. وهذه النتائج تؤكـــد صحـــــة تشخـــيص العـــــــــزلات قيد الدراسة الحالية بعد مقارنتها مع عـــــزلات قياسية عالمـــــية لمعرفة تسلســـــل القواعد النتروجينية لمورثة 18S rRNA التي تُمثِّل المـــورثة المـــرجعية (Refrence gene) لتشخيص العـــــــــزلات. وإنَّ التشخيص الدقيق على المستوى الجزيئي المتمثل بمعرفة التشابه لـ DNA العزلات لهُ فائدة تشخيصية فضلاً عن إمكانية لاستخدام بعضاً من هذه العزلات في التطبيقات العملية كمُعززات حيوية أو دوائية أو في إستخدامها لدراسات الوراثة الجزيئية لا

سيما أنهُ لا توجد دراســــــات سابقة حـــــول تحليل تتابع القواعـــــــد النتروجينية لعـــــــزلات *E. histolytica, E.dispar , E. moshkoviskii* في العراق فأصبحت بيانات الدراسة الحالية هي الاولى من نوعها وبالتالي الإستفادة منها في قاعدة البيانات ضمن موقع NCBI الخاص ببنك الجينات العالمي (Gene Banck).