طريقة البصمة الوراثية لتمييز النمط الوراثي للاكياس المائية المستأصلة من الانسان لمناطق جغرافية مختلفة من القطر[+]

THE FINGERPRINTING DNA METHOD CAN DISCRIMINATE STRAIN OF ISOLATED FROM HUMAN IN DIFFERENT REGIONS OF IRAQ. HYDATID CYSTS

د. سلوى صبر محسن[*] د.يحيى قاسم حسين*

المستخلص :

اعتمدت في هذه الدراسة طريقة البصمة الوراثية Fingerprinting DNA للكشف عن التبيانات الوراثية والتمييز بين دنا الاكياس المائية المستأصلة من الاعضاء المصابة (الكبد). وبعد تحليل العينات والبالغ عددها خمسة عشر عينة موزعة بعدد خمسة عينات لدنا الطفيلي المعزول من المضيف الوسطي الانسان للمناطق الوسطى والجنوبية والشمالية وبالاعتماد على تقانة RAPD لتحديد البصمة الوراثية اظهرت النتائج مايلي:-

- **قدرة البادئ OPF_13 على التوصل لايجاد البصمة الوراثية لدنا عينات الاكياس المائية المعزول من الانسان للمحافظات الوسطى وبنسق متميز بعدد (٥) ، وبعدد (٣) انساق متميزة لدنا عينات المعزول من الانسان للمحافظات الجنوبية ، واعطى (٤) انساق متميزة لدنا عينات المعزول من الانسان للمحافظات الشمالية .**
- **قدرة البادئ OPF_6 على ايجاد بصمة وراثية لدنا عينات طفيلي الاكياس المائية وبانساق متميزة وكما يلي (٥،٤،٣) انساق لدنا عينات المعزول من الانسان للمحافظات الشمالية والجنوبية والوسطى على التوالي .**
- **عدم قدرة البادئ OPF_16 على ايجاد بصمة وراثية لدنا عينات الاكياس المائية المعزول من المضيف الوسطي الانسان للمناطق الوسطى والجنوبية والشمالية المستخدمة في البحث.**
- **قدرة البادئ OPF_19 على ايجاد:-**

١- بصمة وراثية لدنا عينات الاكياس المائية المعزولة من الانسان للمناطق الوسطى وبعدد (٥) انساق متميزة .

٢- بصمة وراثية لدنا عينات الاكياس المائية المعزولة من الانسان للمناطق الشمالية وبعدد (٤) انساق متميزة .

٣- عدم قدرة البادئ على ايجاد بصمة وراثية لدنا عينات طفيلي الاكياس المائية المعزولة من الانسان للمناطق الجنوبية.

[+] تاريخ استلام البحث ٢٠٠٨/٤/٣٠ ، تاريخ قبول النشر ٢٠٠٩/٢/١٥

[*] أستاذ مساعد - المعهد الطبي التقني / بغداد _هيئة التعليم التقني

Abstract :

The fingerprinting DNA method used in this study to detect the DNA of Hydatid Cysts isolated from infected livers and determined the genetic variation between its strains in different geographical regions in iraq from intermediate host human.
After genetic analysis of fifteen samples. Five samples of DNA of Hydatid Cysts isolated from intermediate host human from intermatiat southern and northern regions depending on RAPD marker to derter mined the finger printing DNA. The results shown..
***Abitity of OPF-13 primer to find find fingerprinting of DNA for hydatid cyst collected from human by :-**
a- (5)unique pattaren from intermadiet regions
b- (3) = = = southern =
c- (4) = = = northern =

***Abitity of OPF-6 primer to find fingerprinting of DNA by 5, 4, 3 unique pattaren for Hydatid Cysts DNA collected from human from northern , southerm and intermadiat regions on following .**
***There is no ability of OPF-16 primer to find fingerprinting to DNA of hydatid Cysts in different regions isolated from human .**
***Ability of OPF-19 primer to:**
1- find fingerprinting DNA of Hydatid Cysts by (5)unique pattern.
2- (4) unique pattern for samples collected from human of intermatiedand northern regions in following .
3- There is no ability to opf-19 primer to find fingerprinting DNA for DNA of hydatid cysts collected from human from southern regions of Iraq.

المقدمـــــة :-

يعد داء الاكياس المائية Hydatidosis من الامراض الطفيلية المشتركة بين الانسان والحيوان ، وتتسبب عن الاصابة بالاطوار اليرقية البالغة للشريطيات التابعة لجنس المشوكات *Echinococcus* [١] .

الاصابة اليرقية تتميز بانها تحتاج الى وقت طويل لتنمو الى أكياس مائية Hydatid cyst في الاعضاء الداخلية وبصورة رئيسية في الكبد والرئة للانسان وآكلات الاعشاب التي هي المضائف الوسطية للطفيلي [٢] . يؤثر هذا الداء في الانسان وحيواناته الحقلية خصوصاً في المناطق التي تهتم بتربية الاغنام [٣] . كما يعد الداء من الامراض المتوطنة في العراق ومما يزيد من خطورة هذا الداء في الانسان انه نادراً مايشخص الابعد مرور عدة سنيين من الاصابة اذ ان معظم المرضى تشخص فيهم الاصابة بشكل عرضي [٤] .

وقد أستخدمت في هذه الدراسة تقانة Polymerase Chain Reaction PCR وبالتحديد مؤشر RAPD التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا Random Amplified Polymerase DNA للكشف عن التباينات الوراثية في دنا عزلات طفيلي الاكياس المائية وتـــــــــحديد البصمة الوراثية. [٥]

Fingerprinting Sequences Characterize المضيف الوسطي الانسان من مناطق جغرافية مختلفة من القطر.

حيث هدفت هذه الدراسة تحديد والكشف عن النمط الوراثي لطفيلي الاكياس المائية و مدى وجود فروقات وتباينات

وراثية فيما بينها لانتاج سلالات مهجنة مضعفة تستخدم لاغراض التلقيح للحد من الاصابة بالمرض او التقليل من شدة خطورته. [٥]

المواد وطرائق العمـــل :

تم عزل المادة الوراثية الـــ DNA من عينات الأكياس المائية التي جمعت من المستشفيات في المحافظات الوسطى والجنوبية والشمالية من العراق ومن مصادر(الانسان)وللفترة من تموز٢٠٠٦ ولغاية تموز ٢٠٠٧ . تم أخذ ١ سم^3 من نسيج الطبقة المولدة لكل من الأكياس المائية المستأصلة من (الانسان) والمحفوظة لمدد متباينة في ٧٠% كحول أثيلي ، ووضعت في أنبوب حجم 1.5 مل ، يـــــضاف إليهـــا ٧٠٠ مايكروليـــــــــتر مـــن المـــــــــحلول Protienase buffer [٦] .

قطع النسيج داخل الأنبوب باستخدام مقص حاد معقم صغير الى قطع صغيرة جداً ، ثم أضيف ٣٥ مايكروليتر مـــن المحلول أنزيم Protienase – K ، ثم حضن بدرجة حرارة ٥٥ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة ، بعد ذلـــك أضـــيف١٠ مايكروليتر من المحلول أنزيم محلل الرنا RNAase وحضن لمدة ساعة بدرجة حرارة ٣٧ مئوية ، أضـــيف حجـــم ممائل من محلول فينول / كلوروفورم / كحول الأيزواميل ورج بجهاز الرج الكهربائي المبرد نوع T3-6 Backman Centrifuge لمدة دقيقة واحدة ، ثم طرد مركزياً بسرعة ١٢٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقـــة ، وســـحبت الطبقـــة العلوية ونقلت الى أنبوب نظيف وكررت هذه العملية الى أن أختفت الطبقة البيضاء الوسطية ، أضيف ٠,٦ من حجـــم الرائق كحول الأيزوبروبانول وترك لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة ، ثم طرد مركزيـــاً بـــسرعة ١٤٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق .

أهمل الرائق وغسل الراسب بالكحول الأثيلي ٧٠% مرة وبالكحول الأثيلي ٩٥% مرة أخـــرى ، وتـــرك الأنبـــوب مفتوحاً ليجف تماماً من الكحول ثم أذيب الدنا بإضافة ١٥٠ مايكروليتر من المحلول دارئ TE ، وحضن لمدة ساعتين بدرجة ٦٥ مئوية حتى ذاب تماماً وحفظ بعد ذلك بدرجة حرارة – ٢٠ مئوية .

وبعد أن تم توصيف الدنا Characterization of DNA وذلك بقياس تركيز الدنا وتقدير نقاوته [٧] نجري تفاعل التـــــضاعف المسمى بـــ RAPD اســـــــــتناداً الى [٨]الذي يشمل الخطوات الآتية :-

- تم تحضير خليط التفاعل الرئيسي Master Mix وذلك بمزج المكونات الآتية في أنبوبة معقمـــة وبـــالتراكيز المبينة إزاء كل مادة :-

المكونات	الحجم لعينة واحدة	التركيز النهائي	١٥ انسان
ماء مقطر	١٧,٧	–	٢٦٥,٥
محلول منظم بقوة X ١٠	٢,٥	١X	٣٧,٥
dNTPs	٠,٥	٢٠٠ MM	٧,٥
البادئ	٢	PMol /R	٣٠
انزيم البلمرة	٠,٣	١,٥ u/R	٤,٥

- ثم مزج المكونات جيداً باستخدام vortex لمدة ٣٠ ثانية ، وبعدها يوضع في المنبذة لمدة ٣٠ ثانية لترسيب قطرات المحلول المتعلقة على جدار الأنبوبة .
- وزعت المحتويات للعزلات لكل أنبوبة من الأنابيب الصغيرة Eppendorf سعة (٠,٥ مل) معلمة بأسماء العزلات ٥ لكل صنف قيد الدراسة .
- أضيفت (٢) مايكروليتر من دن كل عينة ممثلة للصنف وذلك بعد إجراء التخافيف للنماذج المركزة باستخدام الماء المقطر للوصول الى الحجم النهائي المطلوب بدء التفاعل التضاعفي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا والذي تراوح بين ١٠–٥٠ نانوغرام لكل مايكروليتر من عينة الدنا [٩] ليصبح الحجم النهائي ٢٥ مايكروليتر.
- مزجت جيداً ووضعت بالمنبذة لعدة ثواني لجمع محتويات التفاعل في قعر الأنبوبة وبعد ذلك أضيف لكل أنبوبة من ٢٠–٢٥ مايكروليتر زيت معدني Mineral oil لمنع التبخر أثناء عملية التضاعف التي تصل فيه درجة الحرارة الى 94 م [١٠].
- نقلت الأنابيب الى جهاز المبلمر الحراري الحلقي

Thermocycler Gene Amp 9700 Applied Biosystem (Thermal Reactor-Hybaid) المباني المنشأ لبدء التفاعل التضاعفي وفقاً للبرنامج الآتي :–

دورة واحدة لمدة ٢ دقيقة على درجة ٩٤ م^{o} للمسخ الأولي لشريط الدنا . ٤٠ دورة تضاعف كل دورة ٢ دقيقة على درجة ٩٢ م^{o} لمسخ القالب ودقيقة واحدة على درجة حرارة ٣٦ م^{o} لربط البادئات بالدنا القالب ٢ دقيقة على درجة حرارة ٧٢ م^{o} لاستطالة البادئات المرتبطة مع دورة اخيرة واحدة للاستطالة لمدة ١٠ دقائق وعلى درجة حرارة ٧٢ م بوصفها دورة أخيرة للاستطالة النهائية .

- رفعت الأنابيب من المبلمر الحراري وتسحب العينات تحت الزيت بحجم (٢٣–٢٤) مايكروليتر ثم أخرج (٣) مايكروليتر من محلول التحميل .
- حضر هلام الأكاروز بتركيز ١,٢% وتم ترحيل العينات بالحفر مع الدليل الحجمي المتكون من دنالامبدا المقطع بأنزيم (Eco1) ولمدة ٤–٥ ساعات .
- تم فحص الهلام بعد صبغه بصفة بروميد الأثيديوم وتحت الأشعة فوق البنفسجية Uv – light صور الهلام باستخدام جهاز تصوير وأقلام من نوع Black ,White Flim Type 667 Polariod
- قدرت الأوزان الجزيئية للقطع المتضاعفة بالاعتماد على مواقع الحزم ذات الأوزان المعروفة والناتجة من قطع دنا الأنزيم (Eco1) فقط التي عدت دليلاً حجمياً قياسياً .
- أختبرت (٤) بادئ وهي :–

OPF – 06	GGGAATTCGG
OPF – 19	CCTCTAGACC
OPF – 13	GGCTGCAGAA
OPF – 16	GGAGTACTGG

من البادئات المنتجة من قبل Operon Technologies Alamed A لاستخدامها في التحاليل النهائية لتجارب الـ RAPD وتم تحويل النتائج التي ظهرت في الهلام الى الجداول Brinary Character وذلك بوضع (١) عند وجود حزمة و (٠) عند غياب الحزمة وتم تقدير الأوزان الجزيئية لنواتج التضاعف موازنة مع الدليل الحجمي Eco1 فقط ولغرض تشخيص كل صنف من الأصناف المدروسة تم إيجاد البصمة الوراثية FingerPrinting للحزم المتضاعفة وتحديد أنواع الأنساق المتميزة للعينات قيد الدراسة وذلك من خلال تحديد (Sequences Characterize) [١١].

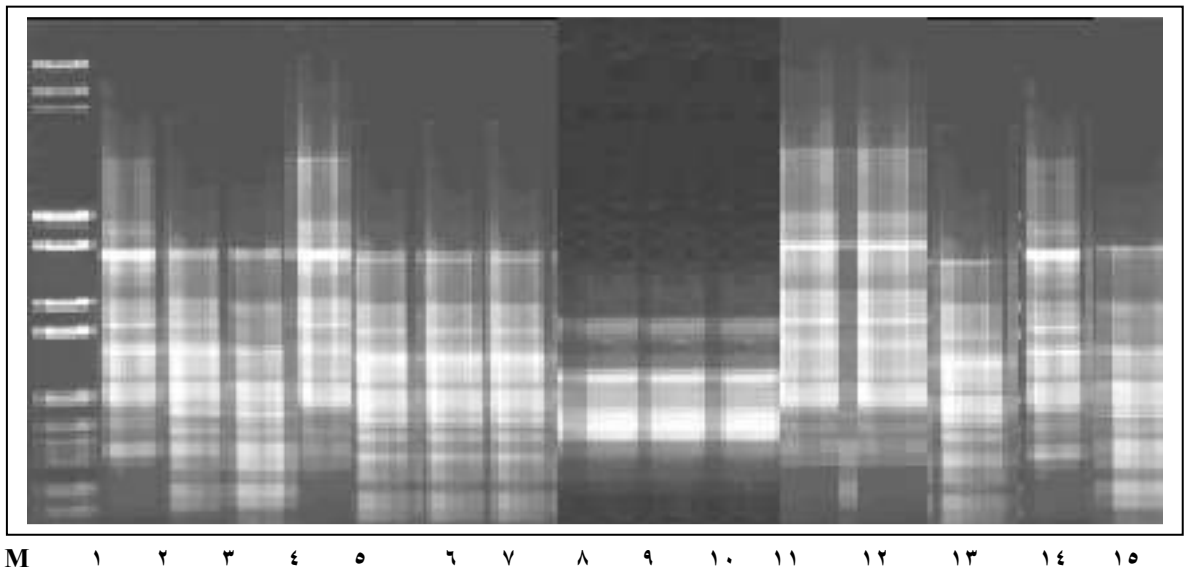
النتائج والمناقشة :-

أتضح من نتائج استخدام البادئات OPF -13 ، OPF-6 ، OPF -16 ، OPF-19 في تفاعلات التضاعف العشوائي المتعدد RAPD اختلافها من حيث إنتاج الحزم المتضاعفة وأوزانها الجزيئية مع كل عينة من عينات دنا الأكياس المائية المعزولة من المضيف الوسطي الانسان لمناطق جغرافية مختلفة من القطر، وكانت النتائج ما يلي :-

١ – البادئ OPF -13

أظهرت مضاعفة دنا الأكياس المائية المعزول من المضيف الوسطي الانسان باستخدام البادئ OPF -13 نسق متميز (Unique pattern) وبعدد خمسة أنواع للنسق المتميز لكل من الدنا المعزول من الاكياس المائية المعزولة من المضيف الوسطي الانسان للمناطق الوسطى بتسلسل الحزم المتضاعفة sequences characterizes للعينات ١–٥، في حين أظهر البادئ تسلسلاً بنسق متميز للحزم المتضاعفة للعينات من ٦–١٠ بعدد ثلاثة والتي تمثل دنا الاكياس المائية المعزولة من الانسان من المناطق الجنوبية ، وأعطى البادئ انساقاً متميزة بعدد اربعة للعينات من ١١–١٥ المعزولة من المضيف الوسطي الانسان من المناطق الشمالية . شكل (١) ، جدول (١).

من هذا يتضح ان لهذا البادئ قابلية على توصيف المادة الوراثية والنمط الوراثي لدنا العينات المعزولة من المضيف الوسطي الانسان للمناطق ذات التوزيع الجغرافي المختلف [١٢]. ولاعطائه اعداد كبيرة من الحزم المتضاعفة ذات الاوزان الجزيئية المختلفة اضافة لامتلاكها قاعدة وراثية عريضة [١١].



شكل (١) يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز ١,٢% للعينات المأخوذة من الاكياس المائية المستأصلة (االانسان) لمناطق جغرافية مختلفة باستخدام البادىء OPF-13 ولمدة ٣,٥ ساعة وبفولتية مقدارها ٦٥ فولت

جدول (١)بين طريقة حساب النسق المتميز (Sequences characterize) باستخدام البادىء OPF-13

Mw bp	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥
١٨٠٠	٠	٠	٠	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	٠	٠	٠
١٦٠٠	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	١	٠
١١٠٠	١	٠	٠	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	٠	١	٠
٩٠٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٧٩٠	١	١	٠	١	١	١	١	١	٠	١	١	١	١	١	٠
٧٧٠	١	٠	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	١	٠	٠	١	١
٧٥٠	١	٠	١	١	١	١	١	١	٠	١	١	١	١	١	٠
٧٣٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠
٦٨٠	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	٠	١	١
٦٣٠	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	٠	١	١
٥٤٠	٠	١	١	٠	٠	١	١	١	١	١	٠	٠	١	٠	١
٤٢٠	٠	١	١	٠	١	١	١	١	١	١	٠	٠	١	٠	١
٣٧٠	٠	١	١	٠	١	٠	٠	٠	٠	١	٠	٠	٠	٠	١
٣٦٠	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	٠	١	١

(٠) تمثل عدم وجود الحزم المتضاعفة

(١) تمثل وجود حزم التضاعف

عدد الالوان يمثل عدد انواع النسق المتميز

العينات من ١– ٥ الاكياس المائية المستأصلة من الانسان من المحافظات الوسطى

العينات من ٦–١٠ الاكياس المائية المستأصلة من الانسان من المحافظات الجنوبية

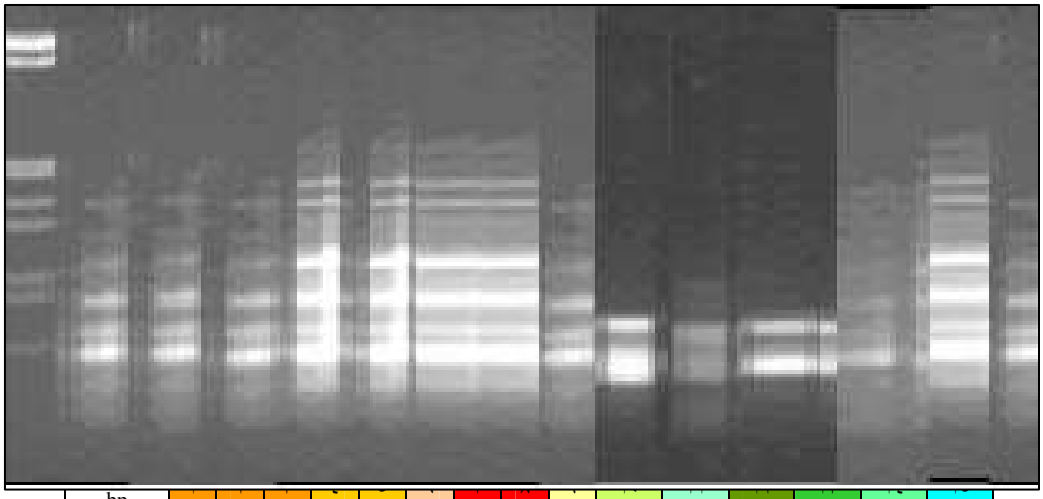
العينات من ١١– ١٥الاكياس المائية المستأصلة من الانسان من المحافظات الشمالية

٢– البادىء OPF – 6

استطاع هذا البادئ ان يعطي توصيفاً وراثياُ لدنا الاكياس المائية المعزولة من الانسان وبنسق متميز وبعـــدد خمـــسة للعينات من١١–١٥ المعزولة من الطفيلي من المضيف الوسطي الانسان للمناطق الشمالية ، وبعدد اربعة انساق متميزة

للعينات من٦–١٠ المعزولة من الطفيلي من المضيف الوسطي الانسان للمناطق الجنوبية واعطى نسقين متميزين للعينات من ١–٥ المعزولة من الطفيلي للمضيف الوسطي الانسان للمناطق الوسطى . شكل (٢) ، جدول (٢) .

ومن خلال هذه النتائج يتبين ان لهذا البادئ قدرة تمييزية عالية على تشخيص العينات المعزولة من المضائف الوسطية الانسان من مناطق الجنوب والوسط والشمال بمؤشرات وراثيةمتخصصة في مجال تحديد البصمة الوراثية والتي اعتمدت في الكشف عن التباين الوراثي للدنا المعزول للطفيلي المستأصل من مضيف وسطي لمناطق جغرافية مختلفة [١٣]. ولشدة وبائية المرض في مناطق الشمال والجنوب ولقدرة البادئ على التوصل الى نتائج جيدة في تحديد الغاية المنشودة وهي أمكانية تطبيق مؤشرات RAPD في توصيف المادة الوراثية للوصول الى تحديد البصمة الوراثية والنمط الوراثي [١٤]، [١٥] .



شكل (٢) يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز ١,٢% للعينات المأخوذة من الاكياس المائية المستأصلة الانسان لمناطق جغرافية باستخدام البادىء OPF-6 ولمدة ٣,٥ ساعة وبفولتية مقدارها ٦٥ فولت

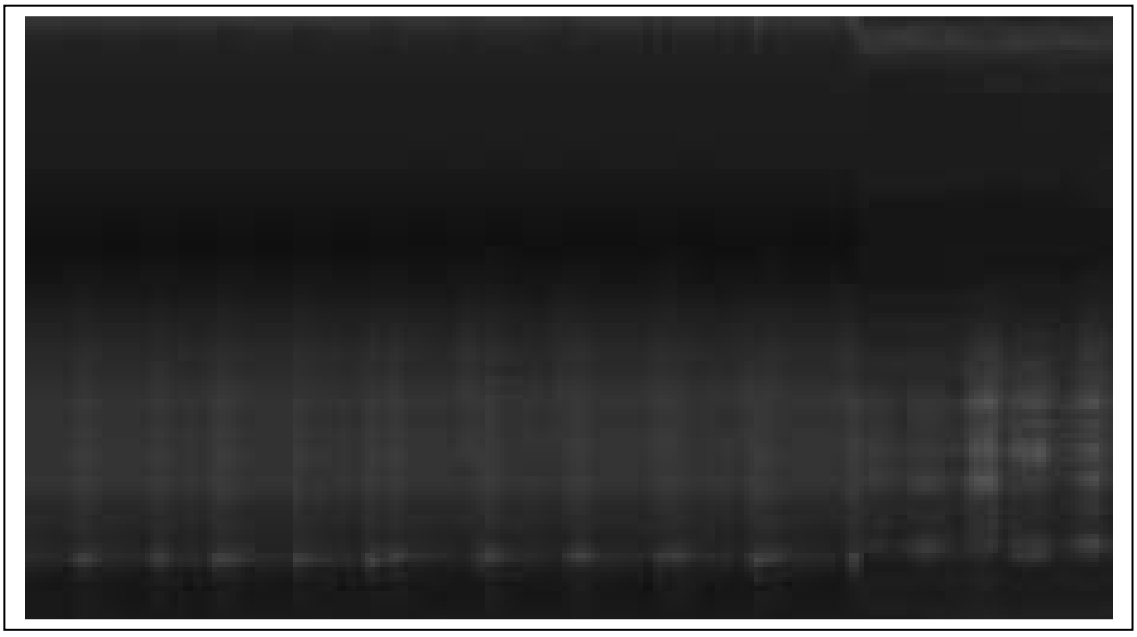
جدول (٢)يبين طريقة حساب النسق المتميز (Sequences characterize) باستخدام البادىء OPF-6

تمثل عدم وجود الحزم المتضاعفة
(١) تمثل وجود حزم التضاعف
عدد الالوان يمثل عدد انواع النسق المتميز

العينات من ١– ٥ الاكياس المائية المستأصلة من الانسان من المحافظات الوسطى
العينات من ٦–١٠ الاكياس المائية المستأصلة من الانسان من المحافظات الجنوبية
العينات من ١١– ١٥الاكياس المائية المستأصلة من الانسان من المحافظات الشمالية

٣ – البادىء OPF – 16

لم يستطيع هذا البادئ من تشخيص عينات دنا الاكياس المائية المعزولة من المضيف الوسطي للانسان للمناطق الجغرافية الوسطى والجنوبية والشمالية بطريقة البصمة الوراثية، وذلك لعدم أمتلاك العينات المدروسة بوجود هذه البادئ لقاعدة وراثية عريضة Broad genetic back ground ، حيث لم يظهر اية قدرة متميزة عالية في اظهار انساق متميزة Unique Pattern [١٦].



M ١٥ ١٤ ١٣ ١٢ ١١ ١٠ ٩ ٨ ٧ ٦ ٥ ٤ ٣ ٢ ١

No .Of Samples

شكل (٣) يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز ١,٢% للعينات المأخوذة من الاكياس المائية المستأصلة من الانسان لمناطق جغرافية باستخدام البادىء OPF-16 ولمدة ٣,٥ ساعة وبفولتية مقدارها ٦٥ فولت

جدول (٣) يبين طريقة حساب النسق المتميز (Sequences characterize) باستخدام البادىء OPF-16

(٠) تمثل عدم وجود الحزم المتضاعفة

(١) تمثل وجود حزم التضاعف

عدد الالوان يمثل عدد انواع النسق المتميز

العينات من ١– ٥ الاكياس المائية المستأصلة من الانسان من المحافظات الوسطى

العينات من ٦–١٠ الاكياس المائية المستأصلة من الانسان من المحافظات الجنوبية

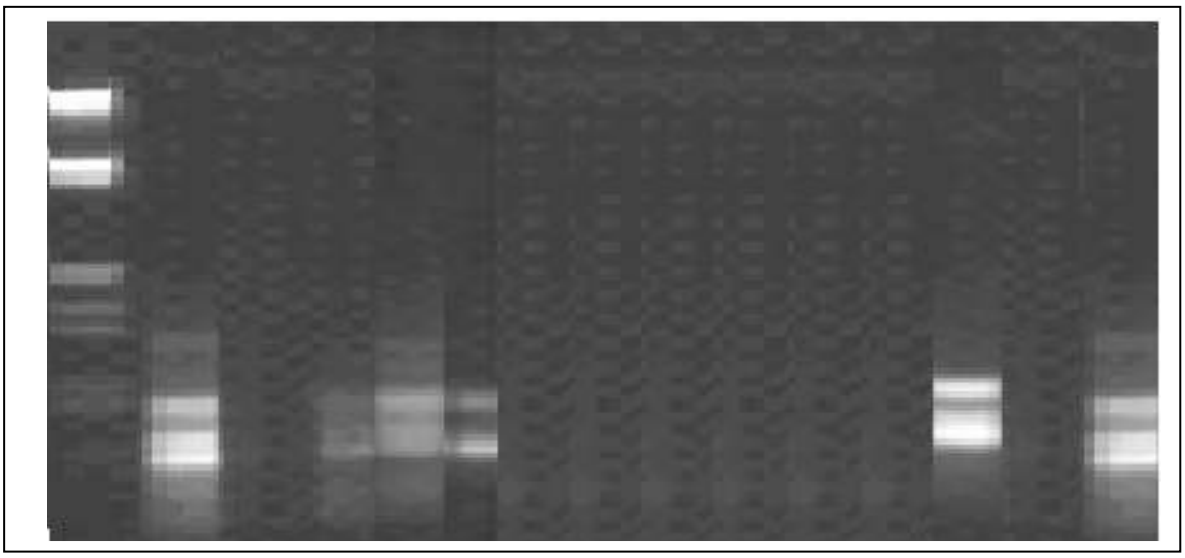
العينات من ١١– ١٥ الاكياس المائية المستأصلة من الانسان من المحافظات الشمالية

٤ – البادئ OPF -19

اظهر هذا البادئ انساقاً متميزة وبعدد (٥) لدنا العينات من ١–٥ المعزولة من الاكياس المائية للمضائف الوسطية الانسان للمناطق الوسطى ولم تظهر اية حزم تضاعف للعينات من ٦–١٠ المعزولة من الاكياس المائية للمضائف الوسطية الانسان للمناطق الجنوبية في حين اعطى هذا البادئ اربعة انساق متميزة للعينات من ١١–١٥ المعزولة من الاكياس المائية للمضائفالوسطية الانسان للمناطق اشمالية ، حيث يتضح في ذلك

Mw bp	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥
٩٨٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠
٩٦٠	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٨٠٠	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٧٦٠	١	١	٠	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠
٧٢٠	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٦٥٠	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠

اختلاف اعداد انواع النسق بين العينات الى ان توزيع المواقع المكملة لهذا البادئ المستخدم في مؤشرات الـ RAPD لم يكن متساوياً بين العينات [١٧].



٢ ٣ ٤ ٥ ٦ ٧ ٨ ٩ ١٠ ١١ ١٢ ١٣ ١٤ ١٥

١

No .Of Samples

شكل (٤) يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز ١,٢% للعينات المأخوذة من الاكياس المائية المستأصلة من الانسان لمناطق جغرافية باستخدام البادىء OPF-19 ولمدة ٣,٥ ساعة وبفولتية مقدارها ٦٥ فولت

جدول (٤) يبين طريقة حساب النسق المتميز (Sequences characterize) باستخدام البادىء OPF-19

Mw bp	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥
١٠٥٠	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
١٠٠٠	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	١
٩٨٠	١	٠	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	٠	١
٩٦٠	١	٠	٠	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	٠	٠	١
٧٥٠	١	٠	١	٠	١	٠	٠	٠	٠	٠	١	٠	١	٠	١
٦٣٠	١	٠	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	٠	١

(٠) تمثل عدم وجود الحزم المتضاعفة

(١) تمثل وجود حزم التضاعف

عدد الالوان يمثل عدد انواع النسق المتميز

العينات من ١– ٥ الاكياس المائية المستأصلة من الانسان من المحافظات الوسطى

العينات من ٦–١٠ الاكياس المائية المستأصلة من الانسان من المحافظات الجنوبية

العينات من ١١– ١٥الاكياس المائية المستأصلة من الانسان من المحافظات الشمالية

ومن خلال هذه الدراسة تم تشخيص دنا عينات طفيلي المشوكات الحبيبية المعزولة من المضيف الوسطي" الانسان" لمناطق جغرافية مختلفة من القطر باستخدام مؤشرات RAPD ومن خلال ترتيب وتسلسل الحزم وحسب اوزانها الجزيئية أي باستخدام البصمة الوراثية،حيث تمكنت البادئات من تشخيص جميع العينات المدروسة [١٨].

المصادر :

1- Zhang ,W.;L.Li and D.P. McManus.Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease .Clin .Microbial.Rev.,16(1):18-36. (2003)

2- Li,J.W.;Zhang and D.P. McManus.Recomint antigen for immunodiagnosis of cystic echinococcosis .Bio .Proced.,6,67-77. (2004)

3-Blanlcton,E.R.Echinococcosis .Current treatment options in infections disease, 3:327-332. .(2001)

4- Khuroo,M.S.Hhdatid disease current status and recent advances .Annal of sandi medicine .22(1)Abstract . .(2002)

5- Turcekove ,L,Snabel V,D Amelios, Bnsi M,Dubinskyp.Morphdogical and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in sovak republic .Acta trop .Fedl; 85(2):223-9. .(2003).

6- Abraham,IC.M.;Iongo,N.S and Hewitt,J.A.Detection of transgene integrants and homologns recombination in mice by polymerase chain reaction in:Meltzer,*S.J.(ed.).Methods in molecular biology* , VOL .92:PCR in bioanalysis .Human press,in C.N.J.223-226 .(1998)

7- Sambrook,J.;Frisch,E.F.and maniatis,T.Molecular cloning:A laboratory manual,2nd edn.Cold spring harbor lab., new York. 436-452.(1989)

8- Williams,J.G.K.;Kubelik,A.R.; Livak,K.J.;Rafalski,J.A. and tingey ,S.V.DNA polymerphisms amplified by arbitrary primers and nseful as genetic markers .Nucl.Acid Res .,18:6531-6535. .(1990)

9- Udupa,S.M.;Weigand.F.;Saxena.M.C.and G.Genotyping with RAPD micro satellite markers resolves path type diversity in the ascochyta blight pathogen of chickpea .Theor APPI.Genet.,97,229-307. .(1998)

10- Weigmand,F.;Baum.M.and udupa,S.DNA molecular markers techniques :technical manual.NO.20.Int.Cent.Agric .Res.Dry Areas,Aleppo. 211-235.(1993)

11- Gasser RB,Zhux,McManus Dp.Dideoxy fingerprinting:application to the genotyping of *Echinococcus* .Int.J.Parasitol,NOV;28(11):1775-1779. .(1998)

12- Siles-Lucas,-M;Felleise,-R;Cuesta-Bndera,-C;Gottstine;B;Eukert, J.Comparative genetic analysis of swiss and Spanish isolates of *Echinococcus graulosus* by southern hybridization and random amplified polymorphic DNA technique .Appl.parasitol.Jnn;35(2):107-17. .(1994)

13-Kamentzky L,S.G.Canova,EA,Gvamera,MC,Rosenzrit. *Echinococcus graulosus* DNA extraction from germinal layers allows strain determination in fertile and nonfertile hydatid cysts.Exp porasitol.95:122-7. .(2000)

14- Scott,J.C.and McManus,D.P. The random amplification of polymorphic DNAcan discriminate species and strains of *Echinococcus* .Tropical. Medicine,and parasitology.45,1-4. .1994)(

15- Zhang –L;Eslami-A;Hosseini-SH;Mcmanus-D,P.Indication of the presence of two distinst strains of *Echinococcus graulosus* in iran by mitochondrial DNA markers.Am-J-Trop-Med-Hyg.Jul;59(1):171-4. .(1998).
16- Bart JM.M.Abdukader.Genotyping of human cystic echinococcosis in X in j an g PR china.Parasitology.O:1-9. .(2006).
17- Varcasia,A.;S.,Cann;MW,Light owter.Molecular characterization of *Echinococcus graulosus* strains in sardinia .Parasitol Res.98-276-7. .(2006)
18- Mwambet.D.K.,Ponce-Gordof cuesta-Ben dera,C. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus graulosus* .Acta.Trop.Jui;91(2):87-93. .(2004)