التوصيف الجزيئي لعزلات المتبرعمة الكيسية من الانسان والأبقار والضأن باستخدام تحليل تعدد أطوال جزء الحصر لجين الوحيدات الصغيرة للحامض النووي الريبوزي الريبوسومي

هيثم صديق البكري وعبد العزيز جميل العاني

فرع الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

(الإستلام ١٥ أب ٢٠١٦؛ القبول ٢١ أيلول ٢٠١٦)

الخلاصة

يعد جنس المتبرعمة الكيسية Blastocystis sp. من الأوالي الطفيلية المعوية أحادية الخلية واللاهوائية والتي تعزل من الإنسان والعديد من الحيوانات الداجنة والبرية، بالإضافة إلى القوارض والزواحف والحشرات. هدفت الدراسة الحالية إلى توصيف المتبرعمة الكيسية المعزولة من براز الإنسان والأبقار والضأن وذلك باستخدام تحليل تعدد أطوال جزء الحصر. حيث تم إختيار أعداد محددة من العينات لكل من الإنسان والأبقار والضأن والتي أظهرت نتيجة موجبة بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل لجين الوحيدات الصغيرة للحامض النووي الريبوزي الريبوسومي وفحصت بطريقة تحليل تعدد أطوال جزء الحصر وذلك بهضمها باستخدام انزيم HinfI وتحديد الأنماط الجزيئية الخاصة بها. وأظهرت نتائج تحليل تعدد أطوال جزء الحصر وجود ثلاث أنماط جزيئية متباينة لعينات الإنسان والتي أظهرت إختلافاً عن أنماط عينات الأبقار التي أظهرت ايضاً ثلاث أنماط جزيئية متباينة، في حين أظهرت الضأن نمطاً جزيئياً واحداً فقط. يتضح من الدراسة الحالية أن تحليل تعدد أطوال جزء الحصر هي تقنية بسيطة وسريعة والتي من الممكن إستخدامها في توصيف وتفريق المتبرعمة الكيسية في الإنسان والحيوانات.

Molecular characterization of *Blastocystis* sp. isolates from human, cattle and sheep by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the small subunit ribosomal RNA gene

H.S. Albakri* and A.A.J. Al-Ani

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq
* Corresponding author Email: haitham_albakri@yahoo.com

Abstract

Blastocystis sp. is an enteric unicellular, anaerobic, protist that could be isolated from humans and many other farm and wild animals, in addition to rodents, reptiles and insects. This study aimed to characterize *Blastocystis* isolated from fecal samples of human, cattle and sheep using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Pre-determined samples were selected from human, cattle and sheep that showed to be positive by polymerase chain reaction (PCR) targeting the small subunit ribosomal RNA gene (SSU-rRNA) then examined by RFLP analysis using *Hinf*I enzyme to determine the molecular patterns. The results of RFLP analysis revealed the presence of three different patterns of human isolates which were in difference with the other three patterns of cattle isolates. However, sheep isolates showed only one pattern. This study shows that RFLP analysis is a simple and rapid technique that could be used to characterize and differentiate *Blastocystis* sp. in humans and animals.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

يعد جنس المتبرعمة الكيسية Blastocystis sp. من الأوالي الطفيلية المعوية أحادية الخلية واللاهوائية والتي تعزل من الإنسان السليم والمريض والحيوانات مثل حيوانات المزرعة كالأبقار والضأن والماعز والخنازير والقطط والكلاب والطيور الداجنة والحيوانات البرية كالقردة والفيلة والنمور والطيور البرية وأنواع أخرى كثيرة من الحيوانات، وبشكل أقل من القوارض والزواحف والسحالي والحشرات (1-6).

حتى وقت قريب كان لا يعرف عن المتبرعمة الكيسية سوى القليل من حيث علم الامراض المشتركة والأوبئة والامراضية والعلاج، ولازال الجدل مستمراً حول الدور الذي يلعبه هذا الطفيلي في ما يسببه من أعراض مرضية للجهاز الهضمي في الإنسان (7-10). وقد جرت العادة في التشخيص السريري أو في الدراسات المظهرية للطفيلي على استخدام المجهر الضوئي بطريقة المستحضر الرطب، أو الشرائح المصبوغة، أو طريقة الزرع (11-13)، ولكن وبسبب تنوع الشكل المظهري للمتبرعمة الكيسية واجهت هذه الطرق تحديدات كثيرة لتشخيص الطفيلي مظهريا وذلك لعدم امكانية تفريقه شكلياً Morphologically indistinguishable، وعليه فقد استخدمت طرق اكثر تطورا مثل المجهر الالكتروني النافذ Transmission electron microscopy (TEM) (14) والمجهر الالكتروني الماسح Scanning electron microscopy (SEM) (15) وغيرها من المجاهر (14-16) وعلى الرغم من تطور تقنيات هذه الطرق إلا أنه لا يمكن بواسطتها ايضاً التمييز بين تحت الأنواع للمتبرعمة الكيسية، لذلك وعلى مدى عقود، بقي تصنيف هذا الطفيلي والتمييز بين أنواعه المعزولة من الإنسان وباقي المضائف بهذه الطرق محل بحثٍ واسع. ولكن في الثلاث عقود الاخيرة أدى استخدام تقنيات البايولوجي الجزيئي Molecular biology methods إلى تطوير تقنيات متميزة مثل تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) للكشف وتصنيف المتبرعمة الكيسية ومن ثم دراسة التباين الجيني لها مما أدى للحصول على معلومات قيمة حول الأنماط الجينية والأهمية السريرية لها (17-20). وقد أعتبر جين الوحيدات الصغيرة للحامض النووي الريبوزي الريبوسومي Small subunit ribosomal RNA gene (SSU-rRNA) كواحد من أهم الجينات التي استخدمت أساساً لتوصيف المتبرعمة الكيسية وتصنيفها فعلى سبيل المثال فقد اختبر كل من كلارك (21) و كنيدا وجماعته (22) البادئ العامة RD5 وRD3 لتضخيم جين الوحيدات الصغيرة بحجم ١٨٠٠bp للمتبرعمة الكيسية. أما يوشيكاوى وجماعته Yoshikawa (23) وريفيرا وجماعته Rivera (24) فقد اختبروا زوجاً آخر من البادئات العامة هما SR1 R وSR1 F على نفس الجين وبحجم 1780 bp. وعليه ففي هذه الدراسة تم توصيف المتبرعمة الكيسية المعزولة من عينات بزار الإنسان ومقارنتها مع عزلات الأبقار والضأن وذلك بتوصيف جين الوحيدات الصغيرة للحامض النووي الريبوزي الريبوسومي باستخدام تحليل تعدد أطوال جزء الحصر Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

تم جمع (٦٢) عينة براز من الإنسان خلال الفترة من تموز ٢٠١٥ إلى شباط ٢٠١٦ ومن أشخاص على تماس مباشر مع الحيوانات بالإضافة إلى الذين ليسوا على تماس مع الحيوانات. تم إعطاء الاشخاص قنينة بلاستيكية سعة ٥٠ مل معقمة لجمع العينة واعطيت رقم تسلسلي وسجلت المعلومات الخاصة بها. أما عينات براز الحيوانات فقد جمعت (٨١) عينة من الأبقار و (٧٨) عينة من الضأن خلال نفس الفترة السابقة وبشكل عشوائي من مناطق مختلفة من مدينة اربيل كالمزارع وسوق الماشية والحالات القادمة للمختبر البيطري المركزي في أربيل. اخذت العينة من مستقيم الحيوان باستخدام قفازات ذات الاستخدام الواحد وبواقع ١٠-٢٠ غم لكل عينة ووضعت كل عينة في قنينة بلاستيكية سعة ٥٠ مل معقمة خاصة بجمع عينات البراز وأعطيت كل عينة رقم تسلسلي وسجلت المعلومات الخاصة بها. حفظت جميع عينات البراز بعد الجمع مباشرة بحاوية تحتوي على الواح تبريد Plastic ice box with cooling element بدرجة حرارة ٤-٨ °م، بعدها نقلت العينات إلى المختبر البيطري المركزي في أربيل، مختبر الطفيليات لإجراء الفحوصات اللازمة وكما يلي.

طريقة الزرع

للحصول على عدد كافي من خلايا المتبرعمة الكيسية تم إجراء طريقة الزرع بحسب دوغرومان وجماعته (25) وذلك بوزن ٥٠ ملغم من البراز، ثم وضعت في أنبوبة بلاستيكية معقمة سعة 3 مل، وأضيف ١ مل من محلول رنكر مع ١٠% مصل الخيول لغرض المجانسة الأولية، بعدها تم إضافة محلول رنكر مع ١٠% مصل الخيول إلى حد الامتلاء، ثم قفل الأنبوب بشكل محكم ووضع في الحاضنة (Memmert، المانيا) بدرجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٣-٤ أيام. بعد إكمال مدة الحضن تم فحص الأنابيب الخاصة بالزرع للكشف عن المتبرعمة الكيسية باستخدام صبغة الوكال ايودين، بعدها استخدمت صبغة الترايكروم مرة أخرى لتأكيد النتائج الموجبة.

إستخلاص الحامض النووي الرايبي منقوص الأوكسيجين (الدنا) من البراز

تم إستخلاص الدنا فقط من عينات البراز المزروع على محلول رنكر مع ١٠% مصل الخيول والتي أعطت نتائج موجبة باستخدام صبغة الوكال ايودين وصبغة الترايكروم وذلك من خلال استخدام العدة الخاصة لاستخلاص الدنا QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen، أمريكا) وبحسب خطوات الشركة المصنعة. بإختصار تتضمن الطريقة وزن ١٨٠-٢٢٠ ملغم من

البراز في أنبوبة أبندورف Eppendorf tube سعة ٢ مل، تم إضافة ١.٤ مل من الدارئ ASL buffer ثم وضعت الأنبوبة في حمام جاف Dry thermal block (Biosan، لاتيفيا) وبدرجة حرارة ٧٠ °م لمدة ٥ دقائق مع استخدام الحرارة الجافة من اجل اتمام عملية تحلل الخلايا وتحرير الدنا DNA منها. بعدها تم استخدام نصف حبة من InhibitEX لكل عينة وذلك للتخلص من المواد المثبطة الموجودة في محلول البراز بالامتصاص بواسطة حبة InhibitEX. بعدها اخذ ٢٠٠ مايكروليتر من السائل الطافي بعد اجراء عملية الطرد المركزي واضيف اليه ١٥ مايكروليتر من انزيم البروتينيز ك Proteinase K، ثم أضيف اليه ٢٠٠ مايكروليتر من دارئ AL buffer ومزجت العينة بجهاز مزج العينات لمدة ١٥ ثانية، ومن ثم حضنت بدرجة حرارة ٧٠ °م لمدة ١٠ دقائق في الحمام الجاف. بعدها تم اضافة ٢٠٠ مايكروليتر من الايثانول (٩٦-١٠٠%) ومزجت بجهاز مزج العينات لمدة ١٥ ثانية. تم نقل المحلول إلى أنبوب عامود الطرد المصغر الحاوي على غشاء السيليكا Silica membrane mini spin column والموضوع في أنبوبة جمع Collection tube ثم وضعت الأنبوبتان معاً في جهاز الطرد المركزي. تم إهمال أنبوبة الجمع التي تحتوي على الراشح واستبدالت بأنبوبة أخرى جديدة، وبعدها أضيف ٥٠٠ مايكروليتر من دارئ Buffer AW1 ثم وضعت الأنبوبتان معا في جهاز الطرد المركزي. اهملت الأنبوبة التي تحتوي على الراشح واستبدالت بأنبوبة أخرى جديدة، لجمع الراشح. تم تكرار العملية السابقة ولكن باستخدام ٥٠٠ مايكروليتر من دارئ Buffer AW2 ثم وضعت الأنبوبتان معا في جهاز الطرد المركزي. تم نقل عمود الطرد المصغرة الحاوية على غشاء السيليكا إلى أنبوبة إبندورف معقمة سعة ١,٥ مل، ثم وضع ٢٠٠ مايكروليتر من دارئ Buffer AE إلى عامود الطرد المصغر الحاوي على غشاء السيليكا، ثم حضنت الأنبوبتان معا بدرجة حرارة الغرفة لمدة ١ دقيقة. بعدها وضعت الأنبوبتان معا في جهاز الطرد المركزي وذلك للحصول على الدنا من غشاء السيليكا. بعدها حفظت أنبوبة إبندورف الحاوية على الدنا المستخلص بدرجة حرارة -٢٠ م لحين اجراء الاختبارات اللازمة.

الكشف عن دنا جنس المتبرعمة الكيسية

استخدمت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن وجود دنا المتبرعمة الكيسية في العينات عن طريق زوج من البادئات العامة Universal primers، البادئ الأمامي Forward primer (SR1 F) تسلسل القواعد النايتروجينية له 5'-GCTTATCTGGTTGATCCTGCCAGTAGT-3' والبادئ الراجع Reverse primer (SR1 R) تسلسل القواعد النايتروجينية له 5'-TGATCCTTCCGCAGGTTCACCTA-3' وحسب يوشيكاوى وجماعته (23) وذلك لتضخيم الدنا DNA amplification بحجم ١٧٨٠bp بغض النظر عن المضيف. تم تحضير المزيج الرئيس Master Mix لتفاعل البلمرة المتسلسل لكل عينة وكما يلي: ٨ مايكروليتر ماء مقطر خالٍ من انزيمات DNA و RNA (DNase/RNase free water)، 12.5 مايكروليتر من المحلول الرئيس لتفاعل البلمرة المتسلسل 2XGoldstar PCR Red Master mix eurogenetics)، بلجيكا) و1.0 مايكروليتر لكل من البادئ الأمامي Forward primer (١٠ بيكومول/مايكروليتر) والبادئ الراجع Reverse primer (١٠ بيكومول/مايكروليتر)، ٢,٥ مايكروليتر من الدنا المستخلص من العينة ليكون الحجم النهائي ٢٥ مايكروليتر لكل أنوبة PCR tube. بعد ذلك تم وضع الأنابيب في جهاز الثيرموسايكلر Thermocycler (Master cycler gradient, Eppendorf) باستخدام برنامج يشمل على دورة واحدة من تمسخ أولي Initial denaturation بدرجة حرارة ٩٤ °م/١٢٠ ثانية بعدها ٣٠ دورة من التضخيم PCR amplification وكل دورة متضمنة على ثلاث خطوات هي خطوة التمسخ Denaturation درجة حرارة 94 °م/ ٤٠ ثانية و الخطوة الثانية الصلب Annealing بدرجة حرارة ٥٧ °م/ ٦٠ ثانية والخطوة الثالثة الاستطالة Extension بدرجة حرارة ٧٥ °م/ ٦٠ ثانية، أخيراً دورة واحدة من الاستطالة Final extension step بدرجة حرارة ٧٥ °م/ ١٢٠ ثانية ثم تبرد الأنابيب بدرجة حرارة (٤-٨ °م) لحين إجراء الترحيل الكهربائي للكشف عن نواتج عملية تضخيم الدنا. جب ملاحظة أن في كل بروتوكول من تفاعل البلمرة المتسلسل لفحص الدنا المستخلص من عينات البراز استخدم فيها عينة السيطرة لتحت الأنواع ST1 أو ST2 أو ST3 أو ST4 المرسلة من قبل الدكتور Christen Rune Stensvold قسم الفطريات والطفيليات، فرع الأحياء المجهرية والسيطرة على العدوى، معهد ستاتينس للمصول، كوبنهاكن، الدنمارك Unit of Mycology and Parasitology, Department of Microbiology and Infection Control, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark.

الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الأكاروز

تم تحضير هلام الأكاروزAgarose gel بتركيز 1.2% من مسحوق الأكاروز (Sigma، المملكة المتحدة). في 100 مل من دارئ (TAE Buffer GeNet Bio ، أمريكا) قوة 1X المخفف والحاوي على 5 مايكروليتر من بروميد الاثيديوم Ethidium (Bromide Promega، أمريكا). وضع هلام الأكاروز المحضر والمتصلب في حوض الترحيل الكهربائي الحاوي على 500 مل من دارئ TAE Buffer قوة 1X، تم وضع ٦ مايكروليتر من كل عينة لنواتج تضخيم العينات وكذلك السيطرة الموجبة والسالبة (الناتجة من تفاعل البلمرة المتسلسل) في الحفر الخاصة والموجودة في هلام الأكاروز، كما استخدم ٢ مايكروليتر من المؤشر DNA Ladder (1Kb)، (Bioneer، كوريا الجنوبية). تم تسليط فرق جهد كهربائي بجهاز الفولتية الخاص بمقدار 80 فولت/٥٥ ملي أمبير/٤,٥ واط لمدة ٩٠ دقيقة بعد إتمام عملية الترحيل، تم وضع هلام الأكاروز على جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV transilluminator، (Cleaver Scientific، المملكة

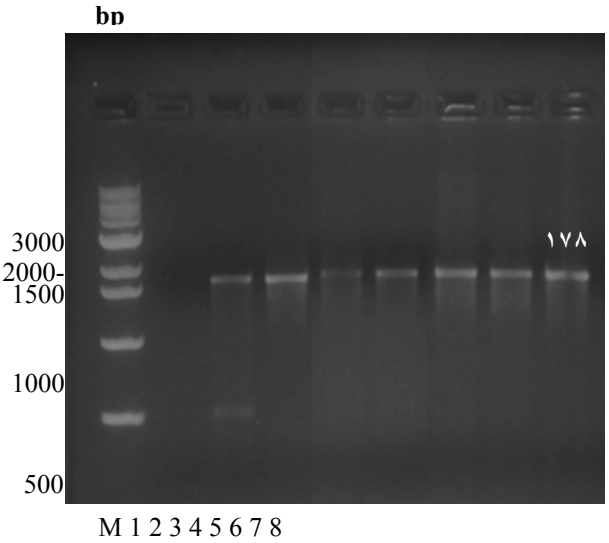
المتحدة). للكشف عن نواتج التضخيم. أما المتبقي من مزيج نواتج تضخيم العينات فقد تم حفظه في التبريد بدرجة حرارة - ٢٠ °م ليستخدم لاحقاً في تحليل تعدد أطوال جزء الحصر بالخطوة التالية.

التوصيف الجزيئي لدنا المتبرعمة الكيسية بتحليل تعدد أطوال جزء الحصر

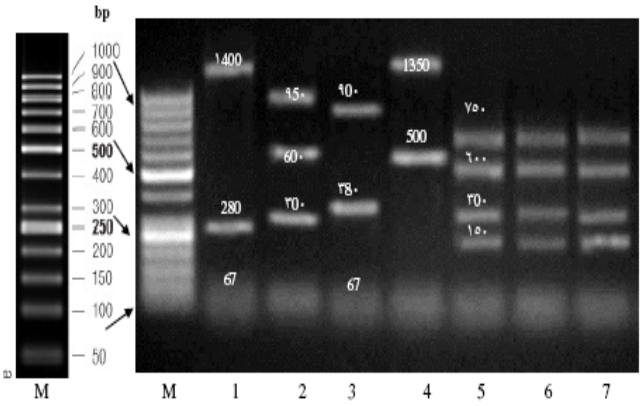
اعتمدت طريقة تحليل تعدد أطوال جزء الحصر لتصنيف المتبرعمة الكيسية وتحديد الصفات الجزيئية لدنا وذلك باستخدام نوع من الانزيمات الحصر Restriction enzyme هو انزيم HinfI الذي يعمل على تقطيع الناتج المتبقي بعد الترحيل الكهربائي لتفاعل المتبرعمة الكيسية والبالغ حجمه bp١٧٨٠ ولجميع المضائف وذلك بعمل مزيج لكل عينة يحتوي على ٣ مايكروليتر ماء مقطر خالي من الانزيمات DNA و RNA و٢٢ مايكروليتر من ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل و ١,٠ مايكروليتر من انزيم HinfI (Fermentas، المانيا) و ٣ مايكروليتر من دارئ الخاص بالانزيم ليكون الحجم النهائي ٣٠ مايكروليتر ثم بعد ذلك حضنت الأنابيب في الحاضنة وبدرجة حرارة ٣٧ °م لمدة ساعتين ثم رحلت على هلام الأكاروز بتركيز ١,٢%. مع المؤشر DNA Ladder، وبجهد كهربائي وكما ذكر سابقاً لمدة90 دقيقة. بعدها فحص هلام الأكاروز بجهاز الأشعة فوق البنفسجية وتم تحديد النمط Pattern أو الأنماط Patterns لكل نوع من المضائف.

النتائج

تم تحديد أعداد العينات الموجبة للمتبرعمة الكيسية في كل مضيف من المضائف المشمولة بالبحث بطريقة الزرع فكانت ٢٨ و ٣١ و ٢٥ عينة موجبة لكل من الإنسان والأبقار والضأن على التوالي. وتم إختيار ١٨ و ٢٠ و ١٦ عينة عشوائياً من بين العينات الموجبة بطريقة الزرع وذلك لفحصها بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام البادئات SR1 F وSR1 R فكانت جميعها موجبة وبنسبة ١٠٠% وبحجم 1780 bp (شكل ١، الجدول ١). تم بعد ذلك إختيار ١٠ و ١٢ و ٨ من العينات الموجبة بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل لكل من الإنسان والأبقار والضأن، على التوالي، وثلاث عزلات سيطرة هي ST2وST3 و ST4 وذلك لفحصها بطريقة تحليل تعدد أطوال جزء الحصر وذلك بهضمها بانزيم HinfI وتحديد الأنماط الجزيئية لها ويبين الجدول ١ هذه الأنماط وأحجامها أما الشكل (٢) و الشكل (٣) يظهر جميع الأنماط المذكوره في الجدول ١ على هلام الأكاروز بنسبة ١,٢%.



الشكل ١: يوضح حجم ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل للمتبرعمة الكيسية 1780 bp لزوج البادئات العامة SR1 R و SR1 F. الممر (M) المؤشر DNA Ladder (1Kb) (Marker)، (Bioneer، كوريا الجنوبية). (1) السيطرة السالبة، (٢) السيطرة الموجبة، (٣ و ٤) عينات الإنسان، (٥ و ٦) عينات الأبقار، (٧ و ٨) عينات الضأن.

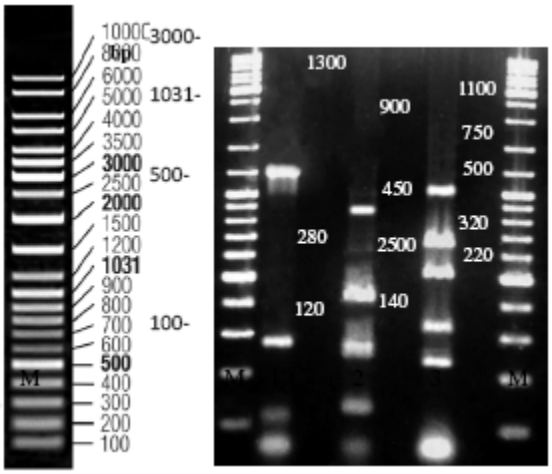


الشكل ٢: يوضح أنماط patternsهضم ناتج تفاعل البلمرة حجم ١٧٨٠ bp بانزيم HinfI الممر (M) المؤشر GeneRuler DNA Ladder (50 bp) (Marker) (Thermo Scientific، المانيا). (١-٤) عينات الإنسان، الضأن، الإنسان، الأبقار، (٥-٧) السيطرة الموجبة ST3 و ST4 و ST5.

الجدول (١) يوضح الأنماط الجزيئية للعينات الموجبة لتفاعل البلمرة المتسلسل بحجمbp ١٧٨٠ لعينات الإنسان والأبقار والضأن للمتبرعمة الكيسية وأعداد العينات المفحوصة بتحليل تعدد أطوال جزء الحصر

المضيف	عدد العينات المفحوصة بتفاعل البلمرة المتسلسل (١٧٨٠bp)	عدد العينات المهضومة بانزيم HinfI	عدد الحزم على هلام الأكاروز	النمط الجزيئي	حجم الحزمة بالـ bp				
					حزمة ١	حزمة ٢	حزمة ٣	حزمة ٤	حزمة 5
الإنسان	١٨	١٠	3	I	1400	280	67	-	-
			3	II	900	380	67	-	-
			3	III	1300	280	120	-	-
الأبقار	٢٠	١٢	2	IV	1350	500	-	-	-
			4	V	900	450	250	140	
			5	VI	1100	750	500	320	220
الضأن	١٦	٨	3	VII	950	600	300	-	-
السيطرة [1]	3	3	4	VIII	750	600	300	150	-

ثلاث عزلات سيطرة هي ST2 و ST3 و ST4.



الشكل ٣: يوضح أنماط patternsهضم ناتج تفاعل البلمرة حجمbp ١٧٨٠ بانزيم HinfI الممر (M) المؤشر (GeneRuler (Marker Mix, Fermentas life sciences). (١) عينة إنسان، (٢) عينة أبقار، (٣) عينة أبقار مخلوطة تحتوي على نوعين من تحت النوع ST.

المناقشة

تعد المتبرعمة الكيسية من الأوالي الأكثر شيوعا في الجهاز الهضمي للانسان وقد عزلت من مختلف المضائف الحيوانية (3 ,6 ,26-27) وحتى وقت قريب كان لا يعرف سوى القليل عن هذا الطفيلي من حيث علم الأوبئة، والمرضية والعلاج وعلى مدى عقود عدة بقي تصنيف المتبرعمة الكيسية والتمييز والتفريق بين أنواعها المعزولة من الإنسان وباقي المضائف بالطرق التقليدية محل جدلاً واسعاً (11-12 ,28). وقد اثبت تحليل جين الوحيدات الريبوزي الصغير Small-subunit ribosomal RNA gene (SSU-rDNA) مفيداً جداً لإثبات أن المتبرعمة من صنف الـ Stramenopile protist (23). اختبر كل من يوشيكاوى وجماعته Yoshikawa (23) وريفيرا وجماعته Rivera (24) زوج البادئات العامة SR1 R وSR1 F على جين الوحيدات الصغيرة للحامض النووي الريبوزي الريبوسومي فكان الناتج حجم 1780 bp وقد استخدم هذا البادئ في البحث الحالي وقد اعطت تفاعلا موجبا لجميع العزلات لعينات للدنا المفحوص ولكل المضائف (الشكل ١ و الجدول ١). إن توصيف جين الوحيدات الصغيرة للحامض النووي الريبوزي الريبوسومي بتحليل تعدد أطوال جزء الحصر والتي تعرف ايضاً بـ Riboprinting وهي تقنية عامة وسريعة وغير مكلفة نسبيا حيث يتم هضم ناتج الـتفاعل البلمرة المتسلسل بانزيمات الحصر والذي يظهر على شكل حزم متباينة الاحجام على هلام الاكاروز(29-31).

وقد أظهرت النتائج أن انزيم Hinf I هو واحد من أفضل الانزيمات التي يمكن ان تستخدم للتمييز والتصنيف بين عزلات المتبرعمة الكيسية وهذا ما ذكره كلارك وجماعته (21) و (32,29,3). لذلك تم استخدام انريم Hinf I في دنا المتبرعمة الكيسية المعزرلة في البحث الحالي وقد أظهرت النتائج تصنيف المتبرعمة الكيسية للمضائف المفحوصة إلى سبع أنماط جينية حيث أخذت عزلات الإنسان ثلاث أنماط مختلفة هي I و II و III أما الأبقار فقد أظهرت كذلك ثلاث أنماط مختلفة هي IV وV و VI أما عزلات الضأن فأظهرت العزلات جميعها نمط جيني واحد هو VII وبهذا يكون عزلات المتبرعمة الكيسية للانسان والأبقار قد أظهرت أنماط وراثية متعددة يمكن من خلالها تمييز عزلات الإنسان عن باقي عزلات الأبقار والضأن وأنه لا يوجد علاقة بين الأنماط هذه (جدول ١ و الشكل ٢ و ٣). وفقد استخدمت دراسات سابقة أنواع من انزيمات الحصر المختلفة والعديد من البادئات المختلف التي تضخم الجين، فقد استخدم كلارك وجماعته (21)

زوج البدئات RD5 وRD3 لتضخيم جين rDNA SSU بحجم ١,٨ كيلوبايت لثلاثون عزلة للمتبرعمة الكيسية معزولة من الإنسان تم هضمها بأحد عشر نوع من انزيمات الحصر شملت HaeIII, TaqI, DdeI, Sau3AI, Sau96I, HhaI, HinfI, RsaI, MspI, AluI BstUI,، وقد كانت النتائج ناجحة لكل من أنزيم HinfI وRsaI حيث أظهرت ٧ أنماط جينية يمكن من خلالها تمييز وتصنيف العزلات المفحوصة. أما يوشيكاوى وجماعته Yoshikawa (23) فأنه استخدم البادئات SR1R و SR1F بدل RD5 و RD3 لهضم ناتج التفاعل بأنزيم HinfI وRsaI وأظهرت النتائج أن أنزيم الحصر HinfI أنتج خمسة أنواع من الأنماط الجينية البشرية، في حين أظهر أنزيم الحصر RsaI أربعة أنواع من الأنماط الجينية البشرية. كذلك استخدم أبي وجماعته (3) زوج البدئات SR1 R وSR1 F لتضخيم جين rDNA SSU بحجم ١,٨٧ كيلوبايت لتحليل تعدد أطوال جزء الحصر في التمييز والتفريق بين ١٢ عزلة للمتبرعمة الكيسية عزلت من الرئيسيات primates وتم هضم العزلات بانزيمات الحصر HinfI و RsaI وأظهرت الدراسة التشابه الجيني بين عزلات الرئيسيات والتراكيب الوراثية من المتبرعمة الكيسية البشرية. وفي بحث آخر استخدم Abe جماعته (29) كذلك نفس التحليل في التوصيف الجزيئي لسبع عزلات للمتبرعمة الكيسية المعزولة من الطيور وقد ايضاً بانزيمات الحصر HinfI و RsaI وأظهرت استخدم نفس زوج البدئات السابق لتضخيم جين rDNA SSU وقد تم هضم العزلات الدراسة تقسيم العزلات الطيرية السبعة إلى ثلاث أنماط جينية وراثية مميزة. لذلك تظهر الطيور الاصابة بالأنماط الوراثية المتعددة وهذا ما سجل ايضاً في الدراسة الحالية في عزلات الإنسان و الأبقار. وأشار الباحث Abe واخرون. في هذا البحث إلى أنه من غير الواضح ما إذا كانت العزلات الطيرية هذه هي حيوانية المنشأ أم لا. كذلك في بحث آخر (32) دراسة التراكيب الوراثية الحيوانية المتبرعمة الكيسية المعزولة من الأبقار والخنازير استخدم نفس زوج البدئات السابق لتضخيم جين rDNA SSU وقد تم هضم ٢٢ عزلة بانزيمات الحصر HinfI و RsaI و HaeIII وأظهرت الدراسة تقسيم العزلات إلى إثنين من التراكيب الوراثية المتميزة هي النمط ١ في عزلة بقرية واحدة، والنمط ٣ في اثنين من عشرة من الأبقار.

يتضح من كل ما تقدم سواء من نتائج البحث الحالي او الدراسات السابقة أن تحليل تعدد أطوال جزء الحصر يعطي نتائج متباينة لوجود الأنماط الوراثية المتعددة ضمن المضيف الواحد او بين المضائف إلا أنه يجب الانتباه إلى أن نوع البادئ المستخدم الذي يعطي بعد ذلك حجم ناتج التفاعل ونوع الانريمات المستخدمة عاملان سيحددنا نتاج الأنماط الوراثية. تعد هذه الدراسة الأولى في القطر باستخدام تحليل تعدد أطوال جزء الحصر التي من الممكن من خلالها التمييز والتفريق بين عزلات المتبرعمة الكيسية المعزولة من الإنسان والأبقار والضأن.

المصادر

1. Abe N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. Vet Parasitol. 2004;120(3):235-242.
2. Abe N, Nagoshi M, Takami K, Sawano Y, Yoshikawa H. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan .Vet Parasitol. 2002;106(3):203-212.
3. Abe N, Wu Z, Yoshikawa H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from birds by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene Parasitol Res. 2003;89:393–396.
4. Bart A, Wentink-Bonnema EM, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJ, van Vugt M, Goorhuis A, van Gool T. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. BMC Infect Dis. 2013;13(1):389.
5. Hemalatha C, Chandrawathani P, Suresh KG, Premaalatha B, Geethamalar S, Sabapathy D, Ramlan M. The diagnosis of *Blastocystis* sp. from animals-an emerging zoonosis. Malays J Vet Res. 2014;5(2):15-22.
6. Ruaux CG, Stang BV. Prevalence of *Blastocystis* in shelter-resident and client-owned companion animals in the US Pacific Northwest. PLoS ONE. 2014;9(9): doi:10.1371/journal.pone.0107496
7. Boreham PFL, Stenzel DJ. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. Adv Parasitol. 1993;32:1-70.
8. Stenzel D, Boreham P. *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microbiol Rev. 1996;9(4):563-584.
9. Salman YJ. Detection of *Blastocystis hominis* among peoples in Kirkuk Province using ELISA and direct microscopy. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2015;4(10):686-695.
10. Frealle E, El Safadi D, Cian A, Aubry E, Certad G, Osman M, Wacrenier A, Dutoit E, Creusy C, Dubos F. Acute *Blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. Emerg Infect Dis. 2015;21(1):91.
11. Elghareeb AS, Younis MS, El Fakahany AF, Nagaty IM, Nagib MM. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in diarrheic patients. Trop Parasitol. 2015;5(1):36-41.
12. YalcinG, DelibasSB. Comparision of different staning methods for detecting Blastocycstis honinis cyst. Turk J Med Sci. 2009;29(6)1370-1375
13. Santos HJ, Rivera WL. Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis* sp. in human stool samples. Asian Pac J Trop Med. 2013;6(10):780-784.
14. Yamada M, Yoshikawa H. Morphology of human and animal *Blastocystis* isolates with special reference to reproductive modes. In: Mehlhorn H, Tan KSW, Yoshikawa H, editors. *Blastocystis*: Pathogen or passenger? An evaluation of 101 years of research. 4. Heidelberg, Germany: Springer 2012. p. 22-25.
15. Cassidy MF, Stenzel DJ, Boreham PF. Electron microscopy of surface structures of *Blastocystis* sp. From different hosts. Parasitol Res. 1994;80:505-511.
16. Mehlhorn H, Tan KSW, Yoshikawa H. *Blastocystis*: Pathogen or passenger? An evaluation of 101 years of research. Heidelberg, Germany: Springer 2012. P. 2, 5, 6, 40, 70.
17. Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. Clin Microbiol Rev. 2014;27(2):371-418.
18. Stensvold CR. *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. Trop Parasitol. 2013; 3(1):26–34.
19. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. Protist. 2013;164(4):497-509.
20. Stensvold CR, Nielsen HV. Comparison of microscopy and PCR for detection of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening platforms. J Clin Microbiol. 2012;50(2):540–541.

21. Clark CG. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. Mol Biochem Parasitol. 1997;87:79-83.
22. Kaneda Y, Horiki N, Cheng XJ ,Fujita Y, Maruyama M, Tachibana H. Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. Am J Trop Med Hyg. 2001;65(4):393-396.
23. Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, Takahashi Y. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. J Clin Microbiol. 2000;38(4):1324–1330.
24. Rivera WL, Tan MA. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates in the Philippines by riboprinting. Parasitol Res. 2005;96:253-257.
25. Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorom K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C,Kustimur S,Altinbas A. Comparison of methods for detection of Blastocystis infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD patients in Ankara, Turkey. PLoS ONE. 2010;5(11): e15484. doi:10.1371/journal.pone.0015484.g001
26. Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, Takahashi Y. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. J Clin Microbiol. 2000;38(4):1324–1330.
27. Rivera WL, Tan MA. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates in the Philippines by riboprinting. Parasitol Res. 2005;96:253-257.
28. Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorom K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C, Kustimur S, Altinbas A. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD patients in Ankara, Turkey. PLoS ONE. 2010;5(11): e15484. doi:10.1371/journal.pone.0015484.g001
29. Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. Infect, Genet Evol. 2014;22:223-228.
30. do Bomfim TCB, do Couto MCM. Morphological diagnosis and occurrence of *Blastocystis* spp. obtained from the stool samples of domestic bird species commercialized in municipal markets. J Parasitol. 2013;5(3):20-26.
31. Parija SC, Jeremiah S. Blastocystis: Taxonomy, biology and virulence. Trop Parasitol. 2013;3(1):17.
32. Abe N, Wu Z, Yoshikawa H. Zoonotic genotypes of *Blastocystis hominis* detected in cattle and pigs by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. Parasitol Res. 2003;90(2):124-128.