مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 20 العدد 1 سنة 2015
علي بستان\محمد كاظم\هادي مدلول ISSN 1997-2490

*التشخيص الجزيئي للمتورقة العملاقة *Fasciola gigantica* من المضيف الوسطي القوقع *Radix sp.* من وسط وجنوب العراق

تاريخ الاستلام : 3\6\2014 تاريخ القبول : 21\8\2014

علي بستان محسن الوائلي* محمد كاظم محمد** هادي مدلول حمزة الميالي***
* قسم علوم الحياة كلية العلوم جامعة القادسية
** متحف التاريخ الطبيعي جامعة بغداد
*** قسم علوم الحياة كلية التربية جامعة القادسية
alimohsen1012@yahoo.cm

الخلاصة :
تم تسجيل القوقع *Radix* sp. كمضيف وسطي للدودة العملاقة *Fasciola gigantica* من خلال تحديد وجود الجين cathepsin L ذو الوزن الجزيئي 1615 زوج قاعدي في انسجة احشاء القوقع المذكور.
حيث اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز باستخدام *Fasciola gigantica* كمجموعة سيطرة ان اربع عينات من القواقع من جنس *Radix* sp. جمعت من الديوانية وواسط والمثنى والبصرة تمثل مضائف وسطية للمثقوبة العملاقة.

كلمات مفتاحية : بطنية الاقدام ، المتورقة العملاقة ، الرادكس

Zoology classification : QL- 360-599.82

المقدمة :
تعتبر القواقع ذات أهمية كبيرة ليس فقط من وجهة نظر علم الرخويات Malacology فحسب، وإنما لها أهمية اكبر من وجهة نظر علم الطفيليات Parasitology بسبب الأعداد الكبيرة من أنواع الديدان الطفيلية التي تقوم بنقلها (8) كما إن لها أهمية اقتصادية مباشرة كونها تمثل مصدرا غذائيا قيما للإنسان والحيوانات أو أنها تمثل آفات خطيرة على المزروعات فمن المعروف أن رخويات المياه العذبة تلعب أدوارا هامة في الصحة البشرية والصحة البيطرية وبالتالي تحتاج إلى استكشافات علمية أكثر وعلى نطاق واسع (22). ويوجد حوالي 100 نوعا من بطنيات القدم في المياه العذبة تعمل كمضائف وسطية intermediate hosts ومأوى ليرقات صنف المخرمات Trematoda في شعبة الديدان المسطحة Platyhelminthes تحت صنف ثنائية المنشأ Digenea كمضيف وسطي أول في اغلب الحالات او كمضيف وسطي ثاني كما في حالة شوكية الفم Echinostomatidae (20).
ان المثقوبتين *Fasciola hepatica* و *F. gigantica* هما من الديدان الكبيرة الحجم المسببة لمرض حلزون الكبد Fascioliasis الذي يصيب الإنسان والمواشي بصورة متزايدة في كل مكان (19) ويجب عدم اعتبار مرض حلزون الكبد Fascioliasis البشري من الأمراض المشتركة الثانوية بل يجب ضمه إلى قائمة الأمراض الطفيلية البشرية المهمة (17 ، 18 ، 11، 6، 14).
كما تعتبر الإصابة بالمتورقة العملاقة *Fasciola gigantica* واحدة من الاصابات الاكثر شيوعا بالديدان الطفيلية المفردة في الحيوانات المجترة في آسيا وأفريقيا (17،18). ان قواقع Lymnaeid تمثل المضيف الوسطي لكل من *Fasciola hepatica* و *F. gigantica* هذه العائلة من القواقع تتوزع في جميع أنحاء العالم. القوقع *Galba truncatula* المسؤول عن نقل المثقوبة *F. hepatica* يتواجد في اوربا بشكل اساسي في حين النوع *Pseudosuccinea columella* يتواجد بشكل اساسي في الامريكيتين وان قدرة هذه الانواع على التكيف مع بيئات جديدة (بما في ذلك المناطق الشاهقة) جعل من داء المتورقات مرض ينشأ في جميع انحاء العالم (23، 19).

*البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول .

وفي العراق درس (3) مراحل نمو وتطور المخرم *Fasciola gigantica* والتغيرات النسيجية المرضية في المضيف الوسطي *Lymnaea auricularia* . كما درس (1) توزيع الأطوار اليرقية لديدان الكبد *Facsiola gigantica* في مضيفها المتوسط *Lymnaea auricularia* . وبين (4) وجود بعض يرقات الديدان المخرمة المتطفلة على افراد بطنية القدم في المياه العذبة في البصرة كما درس (5) انتاجية القواقع *Lymnaea auricularia* المصابة تجريبيا بمهدبات *Fasciola gigantica* من المذنبات فضلا عن توزيعها وانتشارها على النباتات فقد بينت الدراسة وجود اختلاف في اعداد المذنبات المنطلقة وان المذنبات تفضل الاجزاء الخضر من النبات للتكيس عليها.

ان الهدف من هذه الدراسة هو التشخيص الجزيئي للمتورقة العملاقة *Fasciola gigantica* من المضيف الوسطي *Radix sp.* من وسط وجنوب العراق.

المواد وطرائق العمل

1. جمع القواقع Collection of snails

جمعت 62 عينة من قواقع المياه العذبة من جنس *Radix sp.* بشكل عشوائي باليد او بواسطة المجرفة scoop net وذلك من خلال القيام بجولات ميدانية الى محافظات وسط وجنوب العراق خلال المدة من شباط ولغاية أيار 2012 ووضعت في قناني بلاستيكية تحوي 70% ايثانول وسجلت المعلومات عليها كاسم المنطقة وتاريخ الجمع ونوع المسطح المائي .

2. التشخيص المظهري القواقع: Morphological Identification of snails

شخصت القواقع بالاعتماد على الصفات المظهرية للصدفة وعلى التشريح الداخلي للأعضاء التناسلية الذكرية والمعتمدة في العديد من المراجع العلمية ومنها جعفر (2 ،15 ،21 ، 9 ، 12).

3. استخلاص الحامض النووي الدنا الجينومي من القواقع المصابة

استخلص الحامض النووي الدنا الجينومي Genomic DNA من الاجزاء الرخوة من القواقع باستخدام طريقة CTAB والتي وصفت من قبل (10).

4. قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي الدنا Assay DNA yield and quality

كشف عن الحامض النووي DNA المستخلص من العينات باستخدام ألـ NanoDrop spectrophotometer (Thermo ,USA) وذلك من خلال تحديد تركيز الحامض النووي (DNA ng / µl) وقياس نقاوة الحامض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بدرجة (260- 280) نانوميتر .

5. البادىء Primer:

تم اختيار البادئ cathepsin L المصمم من قبل (13) والمستخدم في الكشف عن الاطوار اليرقية للدودة العملاقة *Fasciola gigantica* والذي تم الحصول علية من شركة Bioneer الكورية.

اسم البادىء primer	تسلسل القواعد النتروجينية DNA sequence		عدد القواعد (bp)
cathepsin L	F	5-GTACCCGACAAAATTG ACTG-3	6015
	R	5-TCACGGAAATCGTGCCACC-3	

6. تحضير مزيج تفاعل سلسلة انزيم البلمرة Polymerase chain reaction - PCR

تم تحضير خليط التفاعل Master Mix وحسب تعليمات شركة Promega المصنعة له وذلك باضافة المكونات ادناه الى انبوبة معقمة سعة 1.5 مليلتر وكالاتي :

المكونات	الحجم (مايكروليتر)
Primer F	1
Primer R	1
dNTP	2.5
10x buffer	2.5
25mm $mgcl_2$	1.5
Taq polymyrase	0.5
ماء مقطر	12

تمزج المكونات جيدا بخلطها بألـ Vorex لمدة 30 ثانية ثم توضع في المنبذة لعدة ثواني ثم يضاف 4 مايكروليتر من دنا العينات الى الانبوبة بتركيز 50 نانوغرام / مايكروليتر ليصبح الحجم النهائي 25 مايكروليتر تمزج جيدا وتوضع بالمنبذة لعدة ثواني وتوضع في المبلمر الحراري الحلقي الـ PCR وفق البرنامج التالي .

دورة واحدة بدرجة 95 م لمدة 4 دقائق ثم 29 دورة كل دورة تتضمن : 94 م لمدة دقيقة واحدة و55 درجة لمدة دقيقة واحدة و72 م لمدة دقيقة واحدة ثم دورة واحدة بدرجة 72 م لمدة 10 دقائق .

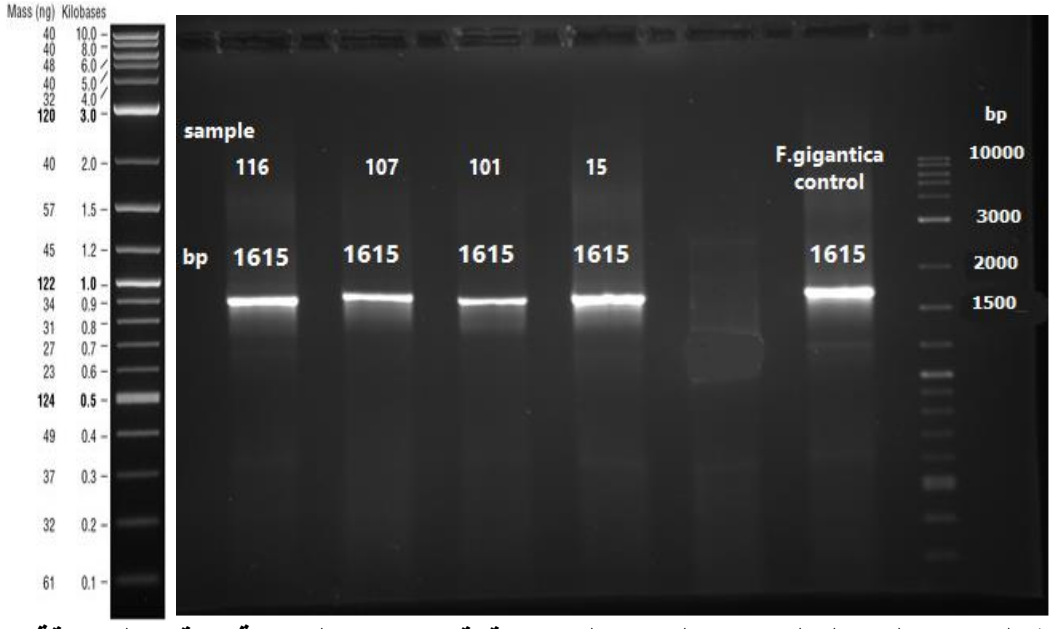
7. الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز : Electrophoresis of agarose gel

- اذيب اغم من هلام الاكاروز agarose في 100 مل من محلول TBE buffer (5X) وتم غليه باستخدام فرن حراري لحين ذوبان الاكاروز بالكامل.
- يبرد المحلول بالماء الجاري ويوضع قي قالب صب الهلام Tray مع تثبيت مشط تكوين الحفر Comb قرب احدى نهاتيه على بعد 1 سم من طرف القالب وترك ليتصلب مدة 30 دقيقة وبعد اكتمال تصلب الاكاروز رفع المشط بحذر.
- نقل الى جهاز الترحيل الكهربائي الحاوي على محلول TBE buffer (5X) .
- اضيف 8 مايكروليتر من Leader 25 ng / µl الى الحفرة الاولى في الاكاروز.
- اضيف 10 مايكروليتر من المزيج (8 مايكروليتر من نواتج التضخيم PCR product و2 مايكروليتر من الصبغة Hind lll λ).
- تم إيصال الأقطاب الكهربائية ثم تم تشغيل جهاز الترحيل الكهربائي على 85 فولت إلى أن تم ملاحظة رحيل الصبغة إلى ثلثي قالب الاكاروز بعدها رفعت الفولتية الى 100 فولت .
- بعد انتهاء الترحيل وضع القالب في صبغة Ethidium bromide لمدة 3 ثواني ثم يستخرج ويوضع في الماء المقطر لمدة 20 دقيقة.

النتائج

تفاعل سلسلة انزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction – PCR

يبين الشكل (1) الترحيل الكهربائي لعينات الحمض النووي الدنا DNA للمتورقة العملاقة *Fasciola gigantica* والتي ضخمت باستخدام تفاعل السلسلة المتبلمرة PCR حيث تظهر حزم الجين التشخيصي cathepsin L للمثقوبة العملاقة بحجم 1615 زوج قاعدي على هلام الاكاروز بالمقارنة مع مجموعة السيطرة التي تمثل الحامض النووي الدنا المستخلص من المثقوبة البالغة حيث ظهرت اربع عينات من القواقع مصابة من الديوانية وواسط والمثنى والبصرة بيرقات المثقوبة العملاقة.



الشكل (1) : الترحيل الكهربائي لعينات الدنا من قوقع *Radix* المصابة بيرقات المتورقة العملاقة *Fasciola gigantica* .

المناقشة

لصعوبة تحديد مذنبات المتورقة العملاقة مظهريا تم استخدام الطرق الجزيئية متمثلة بطريقة تفاعل السلسلة المتبلمر PCR باستخدام البادىء cathepsin L وكانت حزم الحمض النووي الدنا المستخلص من الاجزاء الرخوة من جسم القوقع *Radix* sp. وكانت نتيجة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز ظهور حزم الدنا بحجم 1615 زوج قاعدي وجاءت هذه النتيجة مطابقة مع (15). وعلى حد علمنا فان هذا العمل يمثل الاول من نوعه لإثبات العلاقة بين القوقع *Radix sp.* والمتورقة العملاقة *F. gigantica* على المستوى الجزيئي لأول مرة في العراق. وقد وجد (16) اثنين من الاجسام المضادة وحيدة النسيلة monoclonal antibodies عالية التخصص للمتورقة العملاقة، كما اثبت (7) هذه العلاقة بين القوقع *Galba truncatula* والمتورقة *Fasciola hepatica* في ايران باستخدام تعاقبات Nuclear Ribosomal DNA ITS-2.

ان افراد الليمنيا Lymnaeids التي تمثل المضيف الوسطي للمتورقة *F. gigantica* هي من جنس *Radix* وهي اقل قابلية للتكيف مع بيئات جديدة من القواقع من جنس *Galba* التي تمثل المضيف الوسطي للمتورقة *F. hepatica* وبالتالي هنالك محدودية في التوزيع الجغرافي للمتورقة *F. gigantica* (19).

References

1. المياح ، صبيح هليل ، علي عبد اللطيف العلي وسحبان عبد الأمير حسون (2003). توزيع الأطوار اليرقية لديدان الكبد *Facsiola gigantica* في مضيفها المتوسط *Lymnaea auricularia* المجلة العراقية لعلم الأحياء، المجلد 3، العدد 1:75-085 .
2. **جعفر، إبراهيم احمد (1980).** القواقع المائية في العراق والتحري عن قواقع البلهارزيا البولية ومكافحتها، مديرية الأمراض المتوطنة، قسم البلهارزيا، وزارة الصحة، مطبعة سلمان الأعظمي، بغداد: 47 صفحة.
3. Al-Ali , A. A. (2002) . Stages of growth and development of *Fasciola gigantica* and histopathological changes in the intermediate host *Lymnaea auricularia* . M. Sc. thesis , Basrah University: 88pp.
4. AL- Mayah , S. H.(1998). A preliminary study on some larval trematodes parasites of fresh water gastropods in Basrah , Iraq . Basrah J .sci. ,16(1) : 49-54.
5. Al-Mayah, S. H. and Awad. A- H. H.(2008). Cercarial production of *Lymnaea auricularia* Experimentally Infected With *Fasciola gigantica* and the Distribution of Metacercariae on Grass, J. of Al-Qadisiyah for Pure Science, 13(3) :1-11 pp.
6. Alto, W. (2001) Human infections with *Angiostrongylus cantonensis*. Pacific Health Dialog, 8 (1): 176-182.
7. Ashrafi, K.; Massoud, J.; Holakouie Naieni,K.; Jo-Afshan Mi, N. J.; Mahmoodi , N.; Ebadati, N.; Rezvani SM. ; Artigas, P. ; Bargues MD. and Mas-Coma, S. (2007). Nuclear Ribosomal DNA ITS-2 Sequence Characterization of *Fasciola hepatica* and *Galba truncatula*. Iranian J. Publ. Hlth., 36 (4): 42-49.
8. Bargues, M. D.; Vigo, M.; Horak, P.; Dvorak, J.; Patzner, R. A.; Pointier, J. P.; Jackiewicz, M.; Meier-Brook, C. and Mas-Coma, S. (2001). European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. Infection, Genetics and Evolution,1:85-107.
9. Brown, D. S. (1994). Freshwater snails of Africa and their medical importance. 2nd edition. L.: Taylor and Francis, 673.
10. Doyle, JJ. and Doyle, JL.(1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull.,19:11-5.
11. Farahnak, A.; Setodeh, S. and Moebedi, I. (2006). A Faunistic Survey of Cercariae from Fresh Water Snails: *Melanopsis* spp. and their Role in Disease Transmission. Iranian J. Publ. Health, 35(4) : 70-74.
12. Gloer, P. (2002). Die suswasser gastropoden Nord- und Mitteleuropas. Die Tierwelt Deutschlands. 73. Conchbooks, Hackenheim. 327 pp.

13. Grams, R.; Vichasri-Grams, S.; Sobhon, P.; Upatham, E.S. and Viyanant, V.(2001). Molecular cloning and characterization of cathepsin L encoding genes from *Fasciola gigantica*. Parasitology International 50: 105-114.
14. Ibrahim, M. M. (2007). Prevalence and intensity of *Angiostrongylus cantonensis* in freshwater snails in relation to some ecological and biological factors. Parasite, 14: 61-70.
15. Kaset , C.; Eursitthichai, V. ; Vichasri-Grams, S.; Viyanant, V. and Grams, R. (2010). Rapid identification of lymnaeid snails and their infection with *Fasciola gigantica* in Thailand. Exp. Parasitol., 126: 482–488.
16. Maleewong, W.; Intapan, P. M.; Wongkham,C., Sripa,B.; Sukolapong , V. and Leamviteevanich, K. (1997). Specific Monoclonal Antibodies to *Fasciola gigantica*. Asian Pacific Journal of allergy and immunology, 15: 49-54
17. Mas-Coma, S. ; Bargues, M. D. and Esteban, J. G. (1999a). Human fasciolosis. In: Dalton, J. P. (Ed.), Fasciolosis. CAB international Publishing, Wallingford, 411-434.
18. Mas-Coma, S. ; Esteban, J. G. and Bargues, M. D. (1999b). Epidemiology of human fasciolosis: a review and proposed new classification. Bull. WHO, 77: 340-346.
19. Mas-Coma, S. ; Bargues, M. D. and Valero, M. A. (2005). Fascioliasis and other plantborne trematode zoonoses. Int. J. Parasitol., 35: 1255–1278.
20. Subba Rao, N. V. (1993). Freshwater Molluscs of India. In: Roa K. S. (Ed.). Recent Advances in Freshwater Biology. New Delhi. Animal Publication, 2: 187-202.
21. Subba Rao, N.V. and Dey, A. (1989). Freshwater molluscs in aquaculture. In: Handbook of Freshwater Molluscs of India. Zoological Survey of India: pp. 225-232.
22. Supian, Z. & Ikhwanuddin, A. M. (2002). Population dynamics of freshwater molluscs (Gastropod: *Melanoides tuberculata*) in Crocker Range Park, Sabah. ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC): 9.
23. WHO (1995). Study Group on the Control of Food borne Trematode Infections. Geneva: World Health Organization.

مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 20 العدد 1 سنة 2015
ISSN 1997-2490 علي بستان\محمد كاظم\هادي مدلول

*Moleculare identification of giant liver fluke *Fasciola gigantica* from intermediate host snail *Radix sp*. in middle and south of Iraq

Ali B. M. Al-Waaly*,Hadi M. H. Al-Mayali, and Mohammad K. Mohammad*****
***Department of Biology, College of Science, Al-Qadisiya University, Al-Diwaniya , Iraq**
****Department of Biology, College of Education, Al-Qadisiya University, Al-Diwaniya , Iraq**
*****Iraq Natural History Museum, University of Baghdad, Bab Al-Muadham, Baghdad, Iraq**
alimohsen1012@yahoo.cm

Abstract

Freshwater snail *Radix* sp. was recorded in this study as intermediate host for the giant liver fluke *Fasciola gigantica* through detecting the presence of the gene cathepsin L with molecular weight of 1615 base pairs in the soft parts of snails .

Results of gel electrophoresis using adult *Fasciola gigantica* DNA as control group showed that four *Radix* sp. snail samples collected in Diwaniyah, Wasit, Muthanna and Basra represent the intermediate hosts of *Fasciola gigantica*.

Keywords: *Radixs sp*., Iraq, Gastropoda, Pulmonata, Lymnaeidae.

Zoology classification : QL- 360-599.82

***The Research is a part of an Ph.D Dissertation in the case of the first researcher**