بررسی میکروسکوپی و افتراق انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار با روش PCR در مراکز درمانی زاهدان

علیرضا سلیمی خراشاد*، دکتر علی حقیقی**، دکتر سیما راستی***

* مربی انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان، دانشکده پرستاری مامایی ایرانشهر، گروه بهداشت
** دانشیار گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی
*** استادیار انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کاشان، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی

تاریخ دریافت مقاله : ۸۷/۴/۱۲
تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۳/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: انتامبا هیستولیتیکا تک یاخته ساکن لوله گوارش، سالانه حدود ۴۰ تا ۵۰ میلیون نفر را در سرتاسر دنیا مبتلا به کولیت آمیبی و آبسه کبدی می‌نماید و میزان مرگ ومیر آن حدود ۱۰۰ هزار مورد در سال تخمین زده شده است. بر اساس مطالعات متعدد انتامباهیستولیتیکا و انتامبادیسپار علیرغم شباهت کامل مرفولوژیک، از نظر رفتار بیولوژیک و بیماریزایی با هم تفاوت دارند. این مطالعه با هدف تعیین میزان آلودگی به این دو گونه در مراجعین مراکز درمانی شهر زاهدان انجام شد.

مواد و روش کار: در این مطالعه توصیفی ۱۵۶۲ نمونه مدفوع در فاصله تیر ماه ۱۳۸۳ تا بهمن ماه ۱۳۸۴ در مراکز درمانی زاهدان با روشهای میکروسکوپی، فرمالین- اتر، کشت و PCR جهت تشخیص انتامبا هیستولیتیکا و انتامبادیسپار مورد آزمایش قرار گرفتند. در آنالیز داده ها از آزمون‌های کای – دو،آزمون دقیق فیشر و ناپارامتری من ویتنی استفاده شد و مقادیر $P<0/05$ معنی دار تلقی گردید.

یافته ها: از کل نمونه ها ۸ مورد (۰/۵۱٪) از نظر انتامبا هیستولیتیکا /انتامبادیسپار با روش مستقیم و فرمالین- اتر مثبت بودند و هر ۸ مورد در محیط کشت سرم منعقده و رابینسون کشت داده شدند. سپس با روش PCR و استفاده از دو جفت پرایمر های HSP1 وHSP2 و DSP1 وDSP2، ۷ نمونه تعیین هویت شدند و مشاهده شد که ۶ مورد از این نمونه ها آلوده به انتامبادیسپار بودند.

نتیجه گیری : بررسی به کمک PCR نشان داد که انتامبادیسپار اکثر موارد مشکوک آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار را در مراکز درمانی زاهدان تشکیل می دهد. **(مجله طبیب شرق، دوره ۱۱، شماره ۳، پائیز ۱۳۸۸، ص ٤٧ تا ٥٤)**

کلیدواژه ها: انتامبا هیستولیتیکا، انتامبادیسپار، PCR ، کشت، تشخیص افتراقی

مقدمه

انتامباهیستولیتیکا یکی از تک یاخته های ساکن لوله گوارش انسان، اولین بار در سال ۱۸۷۵میلادی توسط لوش در یک جوان روستایی اهل روسیه مبتلا به اسهال خونی توصیف شد و در سال ۱۹۰۳ توسط شائودین نام انتامبا هیستولیتیکا برای آن برگزیده شد.[۱] طبق برآورد سازمان بهداشت جهانی سالانه حدود۵۰ میلیون نفر در سر تاسر دنیا به انتامبا هیستولیتیکا مبتلا می‌شوند و میزان مرگ و میر آن در سال حدود ۱۰۰هزار مورد تخمین زده شده است.[۲] تا سالهای اخیر چنین تصور می‌شد که گونه انتامبا هیستولیتیکا احتمالاً ۱۰درصد از جمعیت جهان را آلوده کرده باشد.[۳] سرانجام در سال ۱۹۹۷کمیته منتخب سازمان بهداشت جهانی بر اساس یافته های بیوشیمیایی، ایمونولوژیک و ژنتیک اعلام نمود که گونهٔ انتامباهیستولیتیکا در واقع متشکل از دو گونه می باشد: یک گونه بیماری زا، بنام انتامباهیستولیتیکا که بیمار مبتلا به آن باید درمان شود و گونه دیگر به نام انتامبادیسپار غیر بیماری زا که اکثر موارد آلودگی (حدود ۹۰٪) را تشکیل می‌دهد و نیازی به درمان ندارد.[۴] احتمالا میزان واقعی شیوع انتامبا هیستولیتیکا در حدود ۱درصد است.[۳] افتراق دو گونه یاد شده از مهم ترین مسائل بحث برانگیز درتک یاخته شناسی

آدرس نویسنده مسئول: زاهدان، دانشکده پزشکی
Email: Salimi35ali @yahoo.com

www.SID.ir

پزشکی می باشد، چرا که این دو گونه از نظر مرفولوژیکی و با میکروسکوپ نوری از هم قابل افتراق نیستند وتفاوت آنها در بیماری زایی، رفتار بیولوژیک وخصوصیات ژنومی می‌باشد.[۳]

تحقیق در زمینه ایجاد روش‌ها و تکنیک‌های ساده برای افتراق این دو گونه در نمونه های مدفوع ازموضوعاتی است که توسط سازمان بهداشت جهانی در اولویت تحقیقات آمیبیازیس قرار گرفته است.[۴] درحال حاضر افتراق این دو گونه در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و با روشهایی نظیر بررسی الگوی حرکت الکتروفورزی ایزوآنزیم ها، استفاده از آنتی بادی‌های منوکلونال برای شناسایی آنتی‌ژن های اختصاصی و نیز با روش‌های بیولوژی مولکولی نظیر واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) صورت می‌گیرد.[۵] با ساخت و ارائه پرایمرهای اختصاصی برای جداسازی این دو آمیب از یکدیگر، امروزه روش PCR یک روش مطمئن، کارآمد و دقیق می باشد که دارای حساسیت و ویژگی بالایی بوده و می‌تواند تروفوزوئیت و یا کیست های موجود در مدفوع را افتراق دهد.[۶] با این وجود نیاز شدیدی برای یافتن تکنیک‌های ساده، ارزان و قابل اجراتر در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی جهت شناسایی وافتراق این دو گونه در نمونه های بالینی احساس می‌شود. در کشورهایی که آمیبیازیس شایع بوده و به عنوان یک مشکل بهداشتی مطرح است این نیاز محسوس تر می باشد. یکی از مهم ترین مزایای افتراق انتامباهیستولیتیکا از انتامبادیسپار جلوگیری از درمان های غیر ضروری و در نتیجه کاهش هزینه اقتصادی بیمار، عوارض جانبی و مقاومت دارویی می باشد. با توجه به مطالعات متعدد در سایر نقاط کشور برای به دست آوردن شیوع انتامباهیستولیتیکا و انتامبادیسپار و شناسایی کانون های آلودگی هریک و فقدان اطلاعات دقیق در این منطقه این مطالعه طرح ریزی و اجرا شد.

روش کار

این مطالعه توصیفی از تیر ماه ۱۳۸۳ تا بهمن ۱۳۸۴ بـر روی ۱۵۶۲ نمونه مدفوع از مراجعین آزمایشگاه های تشخیص طبی زاهدان انجام شد. جمع آوری نمونه ها پس از هماهنگی با اداره امور آزمایشگاه های استان سیستان وبلوچستان و معرفی به آزمایشگاه رفرانس استان انجام شد. این نمونه ها به دو شکل تهیه و مورد آزمایش قرار می گرفت: نمونه گیری بیماران مبتلا به اسهال مراجعه کننده به آزمایشگاه رفرانس استان در همان محل انجام می گرفت و نمونه مدفوع بیماران مراجعه کننده به بیمارستان ها و سایر آزمایشگاه های دولتی و خصوصی شهر زاهدان پس از هماهنگی با مسئولین این آزمایشگاه ها و انتقال به آزمایشگاه رفرانس استان مورد بررسی قرار می گرفت. پس از بررسی میکروسکوپی نمونه ها با روش مستقیم و فرمالین – اتر، نمونه های حاوی تروفوزوئیت، کیست انتاموبا و نمونه های مشکوک که در دو محیط سرم منعقده اسب [۷] و رابینسون کشت موفقیت آمیز داشتند به گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی منتقل و پس از کشت انبوه در محیط کشت رابینسون و جداسازی رسوب آمیب تا زمان استخراج DNA و انجام آزمایش PCR در فریزر و در دمای $-20^{\circ}C$ نگهداری شدند.

در این مطالعه با توجه به مشکلات موجود برای انجام روش الکتروفورز ایزوآنزیم ها و نیز مشکلات فنی تهیه آنتی بادی های منوکلونال و با توجه به مزیت های روش PCR، این روش برای جداسازی و شناسایی این دو گونه آمیب از یکدیگر در کنار بررسی روتین میکروسکوپی در آزمایشگاه های بالینی استفاده گردید. برای آماده سازی نمونه ها جهت استخراج DNA، پس از چندین پاساژ متوالی و تکثیر تروفوزوئیت ها در محیط رابینسون، مایع رویی خارج و رسوب حاوی آمیب در یک لوله سانتریفوژ تمیز جمع آوری شد. ابتدا جهت شستشوی رسوب مخلوط رسوب و بافر با دور rpm ۱۶۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و این عمل جهت حذف مواد محیط کشت و شست و شوی تروفوزوئیت ها سه مرتبه تکرار شد. در آخرین شستشو پس از خارج کردن مایع رویی در ۱ میلی لیتر از بافر

Archive of SID
www.SID.ir

سوسپانسیون و تعداد تروفوزوئیت ها با استفاده از لام نئوبار شمارش و ثبت گردید. باقیمانده سوسپانسیون در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری تقسیم و پس از ثبت مشخصات تا زمان استخراج DNA در دمای C ۲۰°- نگهداری شد.[۸] با استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی HSP1 و HSP2 برای انتامباهیستولیتیکا و DSP1 وDSP2برای انتامبا دیسپار (جدول ۱) قسمتی از DNA مورد نظر نمونه های موجود در کنار سوش های استاندارد HM-1:IMSS برای انتامباهیستولیتیکا و AS 16 IR برای انتامبا دیسپار آمپلی فای شد و مورد بررسی قرار گرفت.[۸]

جدول ۱: توالی پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی اختصاصی گونه های آنتامبا

گونه	طول پرایمر (bp)	سکانس (5'→3')	پرایمر
E.histolytica	۲۸	GAG TTC TCT TTT TAT ACT TTT ATA TGT T	HSP1
E.histolytica	۲۱	ATT AAC AAT AAA GAG GGA GGT	HSP2
E.dispar	۲۶	TTG AAG AGT TCA CTT TTT ATA CTA TA	DSP1
E.dispar	۱۸	TAA CAA TAA AGG GGA GGG	DSP2

پرایمرهای HSP1 و HSP2 یک قطعه ۳۴۰ جفت بازی و پرایمرهای DSP1 وDSP2 یک قطعه ۴۳۰ جفت بازی را تکثیر می کنند.[۸] پرایمرهای فوق با نام تجارتی Invitrogen به صورت لیوفیلیزه خریداری شد و پس از دوبار تقطیر استریل با آب مقطر ، طبق اطلاعات بروشور مربوطه غلظت ۱۰۰ پیکومول در میکرولیتر (۱۰۰ Pmol/µlit) تهیه و پس از تقسیم درحجم های مشخص در C ۲۰°- نگهداری شد. سایر مواد مورد نیاز واکنش PCR همچون Taq DNA Polymerase ، 10Mm dNTP MIX ، 10X PCR Buffer و 50mM MgCl2 از شرکت سیناژن تهیه وپس از آماده سازی بر اساس دستورالعمل مربوطه مورد استفاده قرا گرفتند. جهت انجام PCR ابتدا محلول مادر (Master Mix) بدون افزودن DNA تهیه گردید، سپس این محلول پس از ثبت مشخصات، در میکروتیوب های ۰/۵ میلی لیتری تقسیم و مقدار DNA مورد نظر مربوط به هر نمونه به آن اضافه شد. پس از انجام سیکل، برای مشاهده محصول PCR از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز (غلظت ۱-۰/۸ درصد برای انجام الکتروفورز محصول استخراج DNA و ۱/۲ درصد جهت الکتروفورز محصول PCR) و برای مشاهده باندها از نور UV استفاده شد.[۸]

توزیع فراوانی انگل های مشاهده شده بر حسب جنس به دست آمد و فاصله اطمینان ۹۵درصد برای شیوع انگلها محاسبه شد. برای مقایسه ابتلا به انگل ها بین دو جنس از آزمون کای-دو یا آزمون دقیق فیشر (بسته به مورد) استفاده شد. جهت مقایسه سنی بین مبتلایان و افراد سالم از آزمون ناپارامتری من- ویتنی بهره گرفته شد. مقادیر p کوچکتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

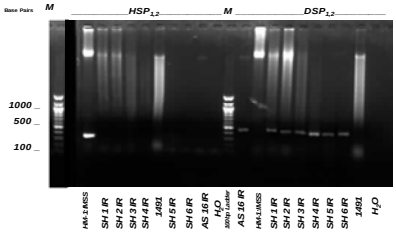
در بررسی میکروسکوپی نمونه ها در حدود ۲۶درصد موارد آلودگی تک انگلی و در ۵ درصد آلودگی توام دیده شد. مجموع نمونه های کشت داده شده ۲۲۸ مورد بود که شامل موارد انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار، موارد مشکوک و تعدادی از نمونه های دیگر همچون بلاستوسیستیس و انتامبا کلی بود. در ۱۶ مورد از نمونه ها کیلوماستیکس مسنیلی، تریکوموناس هومینیس، کیست ژیاردیا لامبلیا وهمینولپیس نانا به مدت ۴۸ ساعت دوام آوردند و در ۸ نمونه تروفوزوئیت های انتامباهیستولیتیکا انتامبادیسپار رشد کردند. تصویر ژل حاصل از الکتروفورز محصول استخراج DNA ۷ نمونه در شکل ۱ نشان داده شده است. برای ایزولاسیون هر انگل تعداد حدود ۲-۱ میلیون تروفوزوئیت با روش فنل-کلروفرم استخراج DNA شد. در یک نمونه موفق به استخراج DNA نشدیم.

Archive of SID
www.SID.ir

شکل۱: تصویر ژل حاصل از الکتروفورز محصول استخراج DNA ۷ نمونه تروفوزوئیت آنتامباهیستولیتکا/دیسپار

پرایمرهای HSP1 و HSP2 نتوانستند روی هیچ یک از ۷ نمونه DNA مجهول قطعه مورد نظر را آمپلی فای کنند و در نتیجه همان‌طور که در باندهای تشکیل شده در شکل ۲ پیداست هیچ‌یک از نمونه های DNA روی ژل آگاروز ۱/۲درصد ردیابی نشدند و در نتیجه انتامبا هیستولیتیکا بودن هر ۷ نمونه منتفی گردید. همچنین با استفاده از پرایمرهای DSP1 و DSP2 یک قطعه شامل ۴۳۰ جفت نوکلئوتید روی DNA استرین AS16 IR در کنار مارکر دارای ۱۰۰ جفت نوکلئوتید ردیابی گردید، این پرایمرها روی DNA ۶ نمونه از ۷ نمونه مجهول قطعه مورد نظر را آمپلی فای و در الکتروفورز ردیابی کردند.

شکل ۲: نتایج آنالیز DNAهای مجهول با DSP1,2 وHSP1,2



همانطور که در تصویر پیداست هیچ یک از پرایمرهای مربوط به آنتامبا هیستولیتیکا و انتامبادیسپار نتوانستند قطعه نوکلئوتیدی مربوط به خود را روی نمونه شماره ۱۴۹۱ آمپلی فای نمایند و نتیجه آن از نظر انتامبا هیستولیتیکا و انتامبادیسپار منفی بود و تنها پرایمرهای DSP1 و DSP2 توانستند روی ۶ نمونه الگوی انتامبادیسپار را نشان دهند. میانگین سنی موارد مثبت در بررسی مولکولی۲۶/۱ سال بود و نیمی از افراد مرد و نیم دیگر زن بودند. جدول شماره ۲ مشخصات نمونه های مثبت در بررسی مولکولی را به تفکیک نشان می دهد.

جدول ۲: مشخصات نمونه های مثبت در بررسی مولکولی

شماره نمونه	سن (سال)	جنس	نتیجه میکروسکوپی	نتیجه کشت	نتیجه PCR
۱۵۴	۲۷	مؤنث	E.histolytica/E.dispar Cyst	E.histolytica/E.dispar Growth	E.dispar(SH1 IR)
۳۸۳	۳۷	مذکر	Dobious Cyst	E.histolytica/E.dispar Growth	E.dispar (SH2 IR)
۶۲۲	۱۸	مذکر	E.histolytica/E.dispar Cyst	E.histolytica/E.dispar Growth	E.dispar (SH3 IR)
۱۱۰۸	۲۳	مؤنث	E.histolytica/E.dispar Cyst	E.histolytica/E.dispar Growth	E.dispar (SH4 IR)
۱۳۸۳	۲۹	مذکر	Dobious Cyst	E.histolytica/E.dispar Growth	E.dispar (SH5 IR)
۱۵۲۷	۲۳	مؤنث	Dobious Cyst	E.histolytica/E.dispar Growth	E.dispar (SH6 IR)
۱۴۹۱	۴۱	مذکر	E.histolytica/E.dispar Trophozoite	E.histolytica/E.dispar Growth	Negative

بحث

در این مطالعه از مجموع ۱۵۶۲ نمونه آزمایش شده از مرحله نمونه برداری تا مرحله بررسی مولکولی ۸ (۰/۵٪) نمونه انتامبا هیستولیتیکا /انتامبادیسپاردر بررسی مستقیم وکشت و ۶ (۰/۴٪) نمونه انتامبادیسپاردر بررسی مولکولی شناسایی شد.

افتراق انتامبا هیستولیتیکا از انتامبادیسپار به لحاظ بالینی و اپیدمیولوژی و همچنین جهت جلوگیری از درمان های غیر ضروری و در نتیجه کاهش هزینه ها، عوارض جانبی و مقاومت دارویی حائز اهمیت می باشد. گرچه روش PCR برای افتراق

Archive of SID

www.SID.ir

این دو گونه بسیار حساس و اختصاصی است ولی به علت هزینه زیاد و پیچیده بودن در آزمایشگاه های تشخیص طبی به خصوص در کشورهای در حال توسعه به صورت روتین استفاده نمی شود. بررسی الگوی حرکت الکتروفورزی ایزو آنزیم ها نتایجی کاملا منطبق با روش PCR دارد ولی نیاز به مهارت و تجربه فراوان دارد، در حالی که روش PCR به علت شناسایی اختلاف موجود در سطح ژنوم دو آمیب، کمتر تحت تأثیر عوامل مداخله کننده قرار گرفته و جواب های قاطعی را به دست می دهد به طوری که در مطالعه Zengzhu [۹] از ۴۲ بیمار مبتلا به آبسه آمیبی کبد که تیتر بسیار بالایی در آزمون الیزا داشتند، با میکروسکوپ نوری فقط در ۸ مورد (۲۹٪) آمیب دیده شد در حالی که با روش PCR همه ۴۲ نمونه مثبت گزارش شد. در بررسی دیگری توسط تاچی بانا[۱۰] از ۱۴ بیمار تنها ۲ بیمار در بررسی میکروسکوپی مثبت شده بودند، اما با بررسی سرولوژیک و استفاده از روش PCR همه ۱۴ بیمار مثبت شدند. بلسمن[۱۱] در سال ۲۰۰۲ نشان داد که PCR قادر به شناسایی انتامبا هیستولیتیکا در کمتر از ۰/۱ در گرم از مدفوع است و سایر گونه های انتامبا نمی توانند این نتایج را تحت تأثیر قرار دهند. Lawson [۱۲] و Pinheiro [۱۳] در سال ۲۰۰۴ و Lebbad و Svard [۱۴] در سال ۲۰۰۵ مزایای روش PCR را در تشخیص انتامبا هیستولیتیکا و انتامبادیسپار را بیش از پیش نشان دادند.

در این بررسی میزان آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا /انتامبا دیسپار با روشهای مستقیم و کشت ۰/۵۱ درصد به دست آمد و در مقایسه با مطالعه ای که اخیرا در ایران انجام گرفته و بسیاری از مناطق کشور را از نظر شیوع انتامبا هیستولیتیکا /انتامبا دیسپار بررسی نمود[۳] میزان آلودگی در مطالعه حاضر پایین تر و حدود یک سوم سایر قسمت های کشور می باشد.

در بررسی گزارشات انگلهای روده ای در آزمایشگاههای مراکز بهداشتی درمانی استان سیستان و بلوچستان میزان آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا /انتامبا دیسپار شهر زاهدان ۰/۵۹ درصد گزارش شده که با نتیجه بررسی حاضر هم خوانی دارد.[۱۵] نتایج مطالعات سایر کشورها نشان می دهد که در هندوستان، چین، اتیوپی، فیلیپین، هلند و برزیل نیز انتامبا دیسپار گونه غالب می باشد. [۳] به نظر می‌رسد انتامبا دیسپار گونه غالب منطقه مورد مطالعه را تشکیل می دهد و روش PCR در عین پیچیدگی و گرانی، با توجه به مزایای تفکیک دو آمیب فوق، به خصوص از نظر صرفه جویی در هزینه درمان و پیشگیری از مقاومت های دارویی، روشی مناسب و کارآمد جهت جداسازی و افتراق انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار از هم می باشد.

از سوی دیگر پیشنهاد می شود به منظور تعیین دقیق میزان شیوع انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار در شرق کشور مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی گسترده تری صورت گیرد چراکه در مطالعات انجام گرفته اکثر مناطق ایران به جز جنوب شرق کشور مورد بررسی قرار گرفته اند. ضمناً بهتر است در مورد روش PCR و طراحی پرایمرها و حذف مواد ممانعت کننده و مهار کننده PCR مطالعات بیشتری صورت گیرد تا بتوان این تکنیک را به نحوی اصلاح کرد که مستقیماً قادر به شناسایی آمیب در نمونه های مدفوع بدون استفاده از محیط کشت باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات جناب آقای دکتر بهرام کاظمی و آقای دکتر یداله محرابی که مشاوره مولکولی و آماری این پژوهش را عهده دار شدند تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Markell Ek, John DT, Krotoski WA. Markell and Vog's Medical Parasitology. 8th ed.1991

Archive of SID
www.SID.ir

2. Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, et al. Geographic Diversity among Genotypes of Entamoeba histolytica Field Isolates. J Clin Microbiol. 2003; 41(8):3748-3756.
3. Hooshyar H. Identification of Entamoeba histolytica ana Entamoeba dispar by PCR Technique in three different regions of Iran [dissertation]. TUMS;2001.
4. WHO/PAHO/UNESCO. A Consultation with Experts on Amoebiasis. Epidemiological Bulletin/PAHO. 1997;18(1):13-14.
5. Tachibana H, Ihara S, Kobayashi S, et al. Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and non – pathogenic isolates of Entamoeba histolytica identified by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991; 29(10): 2234- 2239.
6. Acuna S, Samuelson J, Girolami PD, et al. Application of PCR to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48(1): 58-70.
7. Haghighi A, Rezaeian M. [The Cultivation of Enamoeba histolytica in HSr+s] Persian. J Kerman Univ Med Sci. 1998; 60-64.
8. Zaki M, Reddy SG, Jackson T, et al. Genotyping of Entamoeba species in South Africa: diversity, stability, and transmission patterns within families. J Infect Dis. 2003; 187 (12): 1860-9.
9. Zengzhu G, Bracha R, Nuchamowitz Y, et al. Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for Entamoeba histolytica. J Clin Microbiol. 1999; 37(9):3034-36.
10. Tachibana H, Kobayashi S, Okuzawa E, Masuda G. Detection of pathogenic Entamoeba histolytica DNA in liver abscess fluid by polymerase chain reaction. Int J Parasitol. 1992;22(8):1193-1196.
11. Blessmann J, Ibne Karim M A, Phuong A, et al. Longitudinal study of intestinal Entamoeba histolytica infections in asymptomatic adult carriers. J Clin Microbiol. 2003; 41(10) : 4745-4750.
12. Lawson LL, Bailey JW, Beeching NJ, et al. The stool examination reports amoeba cysts: should you treat in the face of over diagnosis and lack of specifity of light microscopy? Trop Doct. 2004;34(1):28-30.
13. Pinheiro SM, Carneiro RM, Aca IS, et al. Determination of the prevalence of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in the pernambuco state of northeastern Brazil by a polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 2004; 70(2):221-4.

Archive of SID

www.SID.ir

14. Lebbad M, Svard SG. PCR differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar from patients with amoeba infection initially diagnosed by microscopy. Scand J Inf Dis. 2005; 37(9):680-5.

15. Salimi Kh AR, Haghighi A, Hashemi SH M. [Intestinal parasitic reports in Medical centers laboratories of Sistan and Baluchestan province, 2004 – 2005] Persian. Proceedings of the 5th National Iranian Congress on Parasitology and Parasitic Diseases;2005; Tehran, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir

Microscopic Study and Differentiation of Entamoeba Histolytica from Entamoeba Dispar by Polymerase Chain Reaction in Medical Centers of Zahedan

Salimi Khorashad Ali Reza, MSc*; Haghighi Ali, Ph.D; Rasti Sima, Ph.D*****

Received: 2/Jul /2008
Accepted: 7/Jun /2009

Background: *Entamoeba histolytica, resident in large bowel, is the causative agent of an estimated 40 to 50 million cases of amebic colitis and liver abscess, and is responsible for up to 100000 deaths world wide each year. Based on the results of various studies, it is accepted that Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar which are morphologicaly identical, differ in biology and pathogenicity. This study was performed to estimate the prevalence of contamination of stool samples with these species in medical centers of Zahedan city.*

Materials and Methods: *In this descriptive study we used microscopy, Formalin-ether concentration, culture and PCR techniques to differentiate of Entamoeba histolytica from Entamoeba dispar in 1562 stool samples in medical center of Zahedan during July 2004 to January 2006. Data were analyzed with Chi-square, Mann-Whitney and Fisher tests. P value<0.05 considered to be statistically significant.*

Results: *Eight cases (0.51%) of all samples were positive for Entamoeba histolytica/ Entamoeba dispar by direct microscopy and Formalin-ether concentration Methods. All isolates were cultured in HSr+s and Robinson Media. Seven samples were examined by 2 set of oligonucleotid primers $HSP_{1,2}$ and $DSP_{1,2}$ by PCR technique and six isolates were identified to be Entamoeba dispar.*

Conclusion: *This study by using PCR technique showed that most of the patients referred to medical centers of Zahedan were infected with Entamoeba dispar.*

KEY WORDS: *Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, Culture, PCR, Differentiation*

*** Instructor of Parasitology, Dept of Health, Iranshahr Faculty of Nursing and Midwifery, University of Medical Sciences and Health Services, Zahedan, Iran.**
**** Associate Prof, Dept of Parasitology & Mycology, Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.**
*****Assistant Prof of Parasitology, Dept of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedicine, Khashan University of Medical Sciences and Health Services, Khashan ,Iran.**

Archive of SID

www.SID.ir