Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 7:35 +0330 on Tuesday November 19th 2019

پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۷، صفحات ۲۱۳ تا ۲۲۰

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی تنوع ژنتیکی *انتامبا هیستولیتیکا* و *انتامبا دیسپار* در نمونه بیماران با علایم گوارشی در تهران

احسان ناظم‌الحسینی مجرد[۱*]، دکتر علی حقیقی[۲]، دکتر بهرام کاظمی[۲و۳]، معصومه عظیمی‌راد[۱]، محمد رستمی‌نژاد[۱]، زهرا نوچی[۱]، دکتر علیرضا ابدی[۴]، دکتر محمدرضا زالی[۱]

[۱]مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲]گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۳]مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۴]گروه بهداشت و پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: به درستی مشخص نیست که چرا بیماری آمیبیازیس و علایم ناشی از آن، تنها در ۵ تا ۱۰٪ افراد آلوده با *انتاموبا هیستولیتیکا* گزارش گردیده است. تصور می‌شود که تفاوت در میزان بیماریزایی در میان گونه‌های انگل، در برآیند شدت و حدت بیماری آمیبیازیس، مؤثر است. در این مطالعه، علاوه بر تعیین میزان شیوع دو تک‌یاخته *انتامبا هیستولیتیکا* و *انتامبا دیسپار* در بیماران مبتلا به اختلالات گوارشی، تنوع ژنتیکی در ژن غیر کدکننده لوکوس ۲-۱ بررسی شدند تا اختلاف ژنوتیپی انتامباها در نمونه‌های مثبت مشخص گردد.

روش بررسی: از ۱۷۰۰ نمونه مدفوع آزمایش‌شده مربوط به مراجعین به مراکز درمانی تحت پوشش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، جمعاً ۲۷ مورد *انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار* مشاهده گردید که پس از استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با دو جفت پرایمر اختصاصی گونه از ژن لوکوس ۲-۱ انجام گرفت و گونه آمیب، شناسایی و تعیین توالی گردید، و با توالی نوکلئوتیدهای شناخته‌شده *انتامبا هیستولیتیکا* و *انتامبا دیسپار*، مقایسه وتنوع ژنتیکی سویه‌ها بررسی گردید.

یافته‌ها: واکنش PCR با پرایمرهای فوق در ۲۱ مورد از ۲۷ نمونه مورد مطالعه، قطعه حدود ۴۳۰ جفت باز را تکثیر نمود و *انتامبا دیسپار* شناسایی گردید. یک سویه، قطعه‌ای در حدود ۳۴۰ جفت بازی تکثیر کرد و *انتامبا هیستولیتیکا*، شناسایی گردید. پنج مورد از نمونه‌ها تکثیر نشدند و از مطالعه حذف شدند. با PCR و تعیین توالی محصول PCR، تنوع ژنتیکی قابل توجهی از نظر اندازه، نوع و تعداد واحدهای تکرارشونده و ترتیب قرارگرفتن نوکلئوتیدها در ژن لوکوس ۲-۱ سویه‌های *انتامبا دیسپار* ایرانی مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، ۸ الگوی متفاوت و جدید *انتامبا دیسپار* در بین ۲۱ سویه مورد بررسی، مشاهده و به GenBank گزارش شد. سویه *انتامبا هیستولیتیکای* ایرانی (NH1 E.h IR) با سویه استاندارد KU20 (Accession No. AB075706) گزارش‌شده از ژاپن، در ژن لوکوس ۲-۱، همخوانی ژنوتیپی ۱۰۰٪ نشان دادند.

واژگان کلیدی: آمیبیازیس، *آنتامبا هیستولیتیکا*، *آنتامبا دیسپار*، واکنش زنجیره پلیمراز (PCR)، اختلالات گوارشی.

مقدمه

از اولین گزارش آمیبیازیس تاکنون، هنوز پاسخ مناسبی برای این پرسش یافت نشده است که چرا بیماری و علایم ناشی از آن، تنها در ۵ تا ۱۰ ٪ افراد آلوده با انتاموبا هیستولیتیکا گزارش گردیده است. تصور می‌شود که تفاوت در میزان بیماریزایی در میان گونه‌های انگل از سویی و پاسخ‌های متغیر ایمنی میزبان علیه آمیب از سوی دیگر، در برآیند شدت و حدت بیماری آمیبیازیس مؤثر هستند. در حالی که تفاوت در پاسخ ایمنی بدن بر علیه آمیب هنوز ناشناخته می‌باشد، اخیراً تحقیقات گسترده‌ای در مورد پلی‌مرفیسم انتاموبا هیستولیتیکا

*نویسنده مسئول مکاتبات: احسان ناظم‌الحسینی مجرد؛ تهران، اوین، بیمارستان آیت‌ا... طالقانی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دایره تحقیقات بیماری‌های ناشی از غذا و اسهال‌های مزمن؛ پست الکترونیک: ehsanmojarad@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۲/۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۵/۶

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 7:35 +0330 on Tuesday November 19th 2019

صورت گرفته است (۷-۱). بر اساس نتایج مطالعات Clark در سال ۱۹۹۳ با استفاده از PCR-RFLP بر روی سویه‌های *انتامبا هیستولیتیکا*، تنوع در اندازه قطعات بریده‌شده از آنزیم محدودالاثر (AluI) و همینطور تنوع در نواحی تکرارشونده ژن SREHP مشاهده شد. در ۱۸ ایزوله مورد بررسی، ۱۶ الگوی متفاوت، گزارش گردید (۱۰-۸). در تحقیقی که توسط Zaki و همکاران در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت، پلی‌مورفیسم *انتامبا هیستولیتیکا* در دو لوکوس ۲-۱ و ۶-۵ بررسی شد. همچنین این محقق در سال ۲۰۰۲ استرین SAW760/*انتامبا دیسپار* را نیز بررسی و با استرین HM-1:IMSS/*انتامبا هیستولیتیکا* مقایسه نمود که منجر به جداشدن همزمان و تایپینگ این دو انگل شد (۳و۴). همچنین، حقیقی و همکاران در سال ۲۰۰۲ با بررسی چهار لوکوس ۲-۱، ۶-۵، SREHP، و Chitinase در در ایزوله‌هایی که از مناطق محدود جغرافیایی به دست آمده بود، نتایج قابل توجهی را به دست آوردند. در سال ۲۰۰۳، این محقق به کمک همکاران خویش، این بررسی را گسترش دادند و تفاوت‌های ژنتیکی زیادی را بین ایزوله‌های جداشده از ژاپن و ایزوله‌های تایلندی، گزارش نمودند (۱و۲).

Ibne Karim و همکارانش در سال ۲۰۰۵، روشی کاربردی را بر اساس PCR جهت تعیین ژنوتیپ انگل طراحی کردند که اساس آن، تنوع در تعداد واحدهای تکرارشونده در تاندوم کوتاه مرتبط با tRNA ژنوم انگل (از جمله لوکوس ۲-۱) می‌باشد (۱۱). در سال‌های اخیر، مطالعات گسترده مولکولی برای افتراق و تعیین شیوع واقعی این دو گونه در ایران صورت گرفته است. نتایج تحقیقات هوشیار در ۱۳۸۱ در سه منطقه جغرافیایی شمال، جنوب و مرکز ایران، نسبت آلودگی به *انتامبا دیسپار* را ۹۲/۷٪ و *انتامبا هیستولیتیکا* را ۷/۳٪ گزارش نمود (۱۲). سلیمانی نیز با بررسی ملکولی ۸۸ نمونه از افراد دفع‌کننده کیست، همگی را*انتاموبا دیسپار* گزارش نمود (۱۳). در بررسی سلیمی در زاهدان در سال ۱۳۸۴، از ۱۵۶۲ نمونه مورد بررسی، DNA هفت نمونه مثبت استخراج شد و در ۶ مورد، با PCR و پرایمرهای فوق، همگی، *انتامبا دیسپار* شناسایی شدند (۱۴). در مطالعه‌ای در شهرستان گنبد در سال ۱۳۸۶، تمام موارد مشکوک به *انتامبادیسپار/ انتامبا هیستولیتیکا* با PCR با پرایمرهای اختصاصی، انتامبا دیسپار شناسایی شدند (۱۵).

بررسی نتایج این تحقیقات نشان از این دارد که در ایران، انتامبا دیسپار، گونه غالب می‌باشد. مطالعات اندکی در ایران به بررسی تنوع ژنتیکی در ایزوله‌های *انتامبا هیستولیتیکا* و *انتامبا دیسپار* پرداخته‌اند. در مطالعه‌ای که توسط رزمجو صورت گرفته است، تنوع ژنتیکی در ژن Glucose Phosphate Isomerase (GPI) سویه‌های *انتامبا هیستولیتیکا* گزارش گردیده است (۱۶). همچنین در مطالعه‌ای که توسط راستی صورت گرفت با استفاده از PCR-RFLP بر روی ژن SREDP، ۸ الگوی متفاوت در بین ۹ سویه مورد بررسی *انتامبا دیسپار* ایرانی گزارش گردید (۱۷).

اعتقاد بر این است که تشخیص ملکولی انگل به همراه بررسی ژنوتیپ آن در مناطق مختلف، به پیداکردن ارتباطی مابین ایزوله انگل و مکان جغرافیایی آن، کمک شایانی می‌کند؛ که این خود در نهایت، به یافتن مسیر انتقال بیماری و روشن‌شدن منشأ عفونت، منجر می‌گردد (۷-۱). در این مطالعه سعی شده است علاوه بر تعیین میزان شیوع دو تک یاخته *انتامبا هیستولیتیکا* و *انتامبا دیسپار* با روش‌های میکروسکوپی در بیماران مبتلا به اختلالات گوارشی که به برخی از آزمایشگاه‌های مراکز درمانی تحت پوشش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مراجعه کرده‌اند، نمونه‌های مثبت با واکنش PCR، از هم متمایز شده و در نهایت، تنوع ژنتیکی در ژن غیر کدکننده لوکوس ۲-۱ بررسی شوند تا اختلاف ژنوتیپی انتامباها در نمونه‌های مثبت مشخص گردند.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری و مطالعه میکروسکوپی مدفوع: با توجه به نتایج مطالعات گذشته (۱۲)، حجم نمونه تعیین شد و ۱۷۰۰ نمونه به صورت تصادفی از تاریخ خرداد ماه ۱۳۸۵ تا اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۶، از بیماران مبتلا به علایم گوارشی (دل‌درد، دل‌پیچه، اسهال) که به مراکز درمانی تحت پوشش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مراجعه کردند، جمع‌آوری گردید و مورد آزمایش مستقیم، روش رسوبی فرمالین- اتر و رنگ‌آمیزی قرار گرفت و موارد مشکوک، به منظور نگهداری و تکثیر آمیب‌ها، به محیط کشت منتقل شدند (۱۸و۱۹).

محیط کشت سرم منعقده HSr+s (Horse Serum ringer starch): این محیط کشت، از جمله محیط کشت‌های گزنیک می‌باشد و یک محیط دی‌فازیک است که شامل یک قسمت جامد و یک قسمت مایع بوده و محیطی مناسب برای تکثیر و نگهداری *انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار* است. پس از افزایش تعداد ترفوزوئیت‌های آمیب در محیط کشت سرم منعقده، مایع رویی محیط را خارج کرده و رسوب، در یک لوله سانتریفوژ تمیز، جمع‌آوری شده و با شتاب g ۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از خارج‌کردن مایع رویی، رسوب، در لوله تمیزی ریخته شده و پس از ثبت تاریخ و کد

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 7:35 +0330 on Tuesday November 19th 2019

نمونه، تا موقع انجام مراحل بعدی، در فریزر با برودت منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد (۲۰).

استخراج DNA: رسوب، به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و چند بار با بافر TE شستشو داده شد. نیم میلی‌لیتر بافر لیزکننده (2% SDS, 10 mM Trist 5 mM MgCl2, 0.3 M Sucrose) به آن اضافه گردید؛ سوسپانسیون شد، و به مدت ۲۴ ساعت در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا سلول‌ها کاملاً لیز شوند. سپس با استفاده از روش استخراج فنل- کلروفرم، عمل استخراج DNA صورت گرفت (۲۱).

بررسی مولکولی (PCR): برای تعیین گونه و بررسی تنوع ژنتیکی آمیب، برای تمامی موارد مشکوک با دو جفت پرایمر اختصاصی گونه که بر اساس ترادف ژن tRNA ژن لوکوس ۲-۱ با نام DSP1+DSP2 و HSP1+HSP2 (جدول ۱) طراحی شده بودند، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت.

در این مطالعه، از استرین AS 16 IR بعنوان کنترل مثبت *انتامبا دیسپار* و از استرین HM1:IMSS به عنوان کنترل مثبت *انتامبا هیستولیتیکا* و از آب مقطر، به عنوان کنترل منفی استفاده گردید (۴-۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، با شرایط زیر و به تعداد ۳۵ سیکل صورت گرفت (۱و۲و۱۴): دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دناتوراسیون ۳۰ ثانیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، آنیلینگ ۳۰ ثانیه ۵۵ درجه سانتی‌گراد، طویل‌شدن ۹۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد، طویل‌شدن نهایی ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

تعین ترادف ژن: توالی‌یابی محصول PCR با استفاده از دستگاه 3130xl Genetic Analyzer (شرکت Applied Biosystems (ABI)، آمریکا) انجام گرفت و از کیت BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing استفاده شد. قسمت‌های پلی‌مورف ژن، با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها

از ۱۷۰۰ نمونه مورد بررسی، ۷۸۷ نفر (۴۶/۳٪) را افراد مذکر و ۹۱۳ نفر (۵۳/۷٪) را افراد مؤنث تشکیل دادند. در بررسی میکروسکوپی (آزمایش مستقیم، روش رسوبی و رنگ‌آمیزی)، از مجموع کل نمونه‌ها، تعداد ۲۷ نمونه مشکوک به *انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار* تشخیص داده شد که در محیط سرم منعقده، کشت شدند و در نهایت، پس از رسوب‌گیری، DNA استخراج گردید و جهت تعیین گونه انگل، واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام شد. در مجموع، طی این مطالعه، از ۲۷ نمونه (۱/۶٪) *انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار* در بررسی مستقیم، ۲۱ نمونه (۱/۲۴٪) *انتامبا دیسپار* و یک نمونه (۰/۰۶٪) *انتامبا هیستولیتیکا* با PCR، تأیید شد (جدول ۲). تعداد ۵ نمونه (۰/۳٪) با روش ملکولی تکثیر نشدند و لذا از محاسبه، حذف گردیدند. میزان فراوانی *انتامبا دیسپار* به *انتامبا هیستولیتیکا*، ۹۵/۵٪ در مقابل ۴/۵٪ به دست آمد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، محصول واکنش PCR نمونه‌های مثبت، شامل ۲۱ نمونه *انتامبا دیسپار* و یک نمونه *انتامبا هیستولیتیکا*، تعیین توالی شدند و میزان همخوانی و شباهت ژنوتیپ‌ها پس از اصلاح، با استفاده از ایزوله‌های موجود در GenBank و با کمک نرم‌افزار Blast مقایسه شدند (تصاویر ۱و۲). در این تحقیق، تنوع قابل‌توجهی از نظر اندازه ژن، نوع و تعداد واحدهای تکرارشونده و همچنین، ترتیب قرارگرفتن نوکلئوتیدها در ایزوله‌های *انتامبا دیسپار*، مشاهده گردید. سکانس ژن، توالی‌های متنوعی از نظر تعداد نوکلئوتید از ۴۱۴ تا ۴۶۸ نوکلئوتید (بدون احتساب ۵۰ نوکلئوتید اول ژن که تعیین ترادف نشد) را مشخص نمود که مؤید وجود تفاوت در اندازه محصول PCR است (تصویر ۲). مشخصات نمونه‌های مثبت، در جدول شماره ۲ آمده است. ترادف نوکلئوتیدهای ۸ ایزوله که با یکدیگر و با تنها ایزوله ثبت شده موجود در GenBank متفاوت بودند، با شماره‌های AB354125 تا AB354132 در بانک اطلاعات ژنی GenBank/DDBJ/EMBL ثبت شده است.

جدول ۱) ترادف دو زوج پرایمر جهت تکثیر ژن لوکوس ۲-۱*انتامبا هیستولیتیکا* و*انتامبا دیسپار*

نام پرایمرها	ترادف از ′۵ به ′۳
Hsp1 (forward)	GAGTTCTCTTTTTATACTTTTATATGTT
Hsp2 (Reverse)	ATTAACAATAAAGAGGGAGGT
Dsp1 (Forward)	TTGAAGAGTTCACTTTTTATACTATA
Dsp2 (Reverse)	TAACAATAAAGGGGAGGG

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 7:35 +0330 on Tuesday November 19th 2019

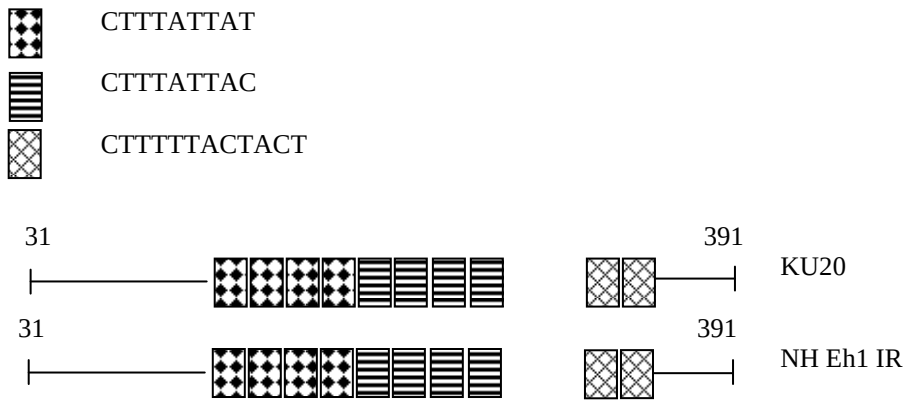
جدول شماره ۲) مشخصات ایزوله‌های مثبت *انتامبا هیستولیتیکا* و *انتامبا دیسپار*

کد ایزوله	نام گونه	جنس	سن	علایم گوارشی	محل نمونه‌گیری
NH Eh1 IR	*E. histolytica*	زن	۲۵	اسهال خونی	بیمارستان طالقانی
NH 1 IR	*E. dispar*	زن	۲۰	درد شکم	بیمارستان طالقانی
NH 2 IR	*E. dispar*	مرد	۶	درد شکم	بیمارستان طالقانی
NH 3 IR	*E. dispar*	مرد	۲۲	درد شکم، اسهال	بیمارستان طالقانی
NH 4 IR	*E. dispar*	مرد	۳۲	درد شکم	بیمارستان طالقانی
NH 5 IR	*E. dispar*	زن	۲۷	درد شکم، اسهال	بیمارستان طالقانی
NH 6 IR	*E. dispar*	مرد	۶۳	درد شکم	بیمارستان طالقانی
NH 7 IR	*E. dispar*	مرد	۳۳	درد شکم	مرکز تحقیقات گوارش
NH 8 IR	*E. dispar*	زن	۲۴	درد شکم، اسهال	مرکز تحقیقات گوارش
NH 9 IR	*E. dispar*	زن	۳۶	درد شکم، اسهال	مرکز تحقیقات گوارش
NH 10 IR	*E. dispar*	مرد	۳۸	درد شکم	مرکز تحقیقات گوارش
NH 11 IR	*E. dispar*	زن	۶۳	درد شکم	مرکز تحقیقات گوارش
NH 12 IR	*E. dispar*	مرد	۶۴	درد شکم، اسهال	مرکز تحقیقات گوارش
NH 13 IR	*E. dispar*	مرد	۴۲	اسهال	مرکز تحقیقات گوارش
NH 14 IR	*E. dispar*	مرد	۵۴	اسهال	مرکز تحقیقات گوارش
NH 15 IR	*E. dispar*	مرد	۵۳	درد شکم، دل‌پیچه	مرکز تحقیقات گوارش
NH 16 IR	*E. dispar*	زن	۸	اسهال	بیمارستان مفید
NH 17 IR	*E. dispar*	مرد	۱۴	درد شکم	بیمارستان مفید
NH 18 IR	*E. dispar*	زن	۱۲	درد شکم، دل‌پیچه	بیمارستان مفید
NH 19 IR	*E. dispar*	زن	۱۰	درد شکم، اسهال	بیمارستان مفید
NH 20 IR	*E. dispar*	زن	۵	درد شکم، اسهال	بیمارستان علی‌اصغر
NH 21 IR	*E. dispar*	زن	۷	درد شکم، اسهال	بیمارستان علی‌اصغر

تصویر ۱) ترادف ناحیه پلی مورف ایزوله NH Eh1 IR/*انتامبا هیستولیتیکا* با اندازه ۳۶۱ نوکلئوتید و تصویر شماتیکی آن در کنار همان ناحیه در ایزوله KU20

GACCGGGGTT CGAATCCCCG TTGAAGAGTT CTCTTTTTAT ACTTTTATAT GTTTATATCC TTATATGTTT ATATGTTTAT ATCCTTATTT ATTATTCTTT TATATTCTTA TCACTTCCTA
CTACTCTTAT TTATTATCCT TATTATATCT ATTCTTACTC CCTATCTTTA TTATCTTTAT TATCTTTATT ATCTTTATTA TCTTTATTAC CTTTATTACC TTTATTACCT TTATTACCTT TATTATATCT ATTCTCACTT CCTATACGTA CTCTTTTTAC TACTCTTTTT ACTACTCTTC TTACTATACC TCTTACTACT CCTACTTTCA CCTCCCTCTT TATTGTTAAT GGGGGTGTAA
G

توضیح: ناحیه‌ای که زیر آن خط کشیده شده است، ناحیه پلی‌مورف می‌باشد که تصویر شماتیک آن با تعداد ۱۰ واحد تکرارشونده در کنار ایزوله استاندارد (KU20, AB075706) مشخص شده است.

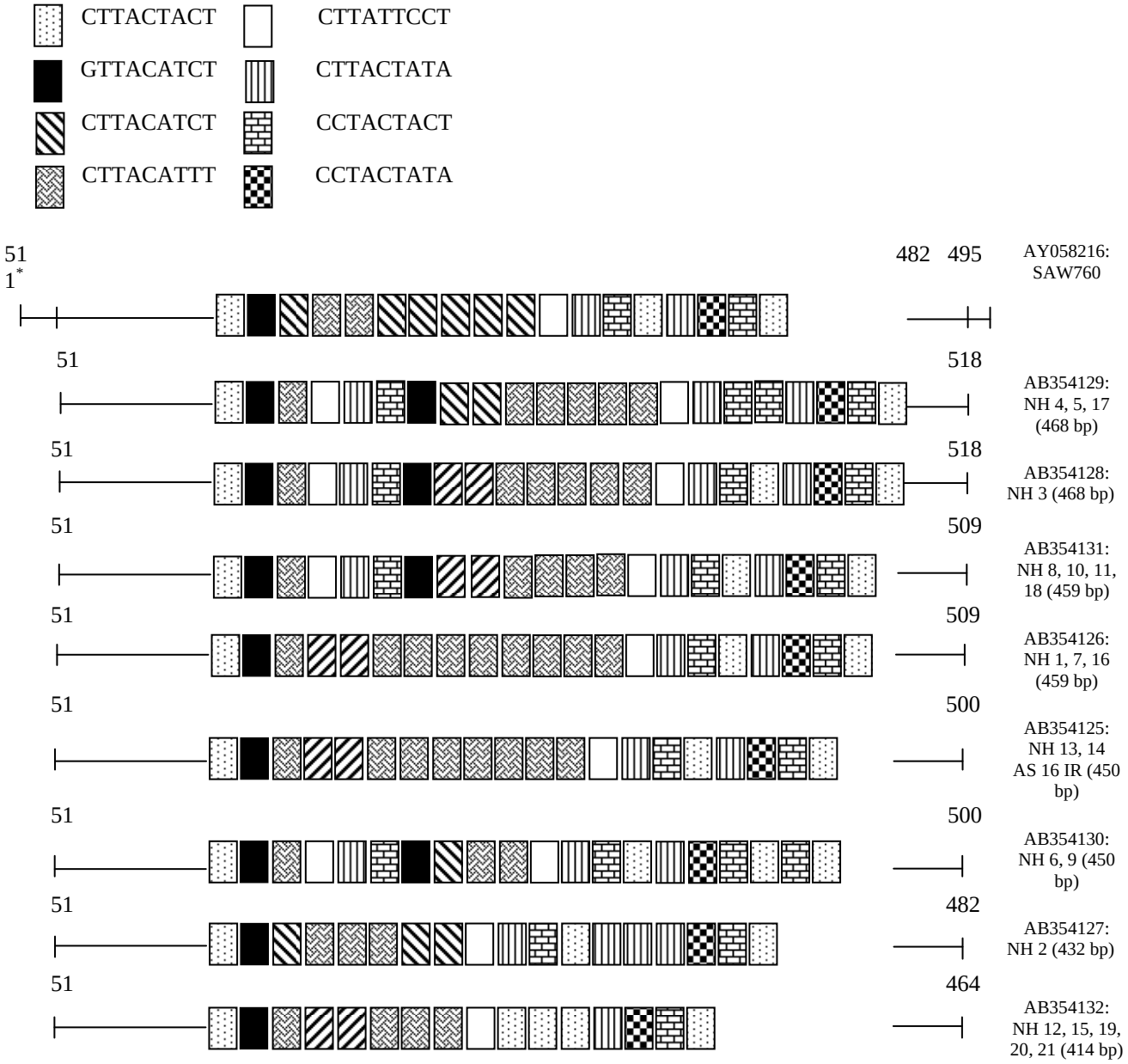


Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 7:35 +0330 on Tuesday November 19th 2019

تصویر ۲) ترادف ایزوله NH 1 IR انتامبا دیسپار با اندازه ۴۵۹ نوکلئوتید و تصویر شماتیک آن در کنار همان ناحیه از دیگر ایزوله‌های ایرانی و تنها ایزوله *انتامبا دیسپار* موجود قبل از این مطالعه در GenBank (AY058216 و SAW760)

TTGAAGAGTT CACTTTTTAT ACTATATATA TGTATATATT CTTATTTATT AGTCACTTAT ACTATTAACT TTATCTATTC CTCTTATATA TTATACTTAT TATACTTATT ATATATATTA TATCTATTCT TACTCTATAC CTTTATTATA TTATTTATAT TATATATATT ATATATATTT ATTATCCTTA TTATTTTTAT TATTCCACTT CTTATCTATT ATATCTATTC TCACTTCTTA TACTTACTAC TGTTACATCT CTTACATCTC TTACATTTCT TACATTTCTT ACATCTCTTA CATCTCTTAC ATCTCTTACA TCTCTTACAT CTCTTACATC TCTTACATCT CTTACATCTC TTATTCCTCT TACTATACCT ACTACTCTTA CTACTCTTAC TATACCTACT ATACCTACTA CTCTTACTAC TCCTACTTTC CCCCTCCCCT TTATTGTTG

توضیح: ناحیه‌ای که زیر آن خط کشیده شده است، ناحیه پلی‌مورف می‌باشد که تصویر شماتیک آن، با تعداد ۲۱ واحد تکرارشونده در کنار ایزوله استاندارد (AY058216 و SAW1627) نیز مشخص شده است. نام ایزوله‌های مشابه و شماره آنها در GenBank در سمت راست تصویر شماتیک هر ژن مشخص شده است.



*در تصویر شماتیک فوق، ۵۰ نوکلئوتید ابتدا و ۱۳ نوکلئوتید انتهای ژن‌ها که ثابت هستند، به دلیل عدم تعیین ترادف در مقایسه با ژن موجود در GenBank، حذف و از نوکلئوتید شماره ۵۱ نشان داده شده است.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 7:35 +0330 on Tuesday November 19th 2019

بحث

یکی از تحولات مهم در زمینه آمیبیازیس در دهه گذشته، متمایزشدن تک‌یاخته بیماریزای *انتامبا هیستولیتیکا* از گونه غیربیماریزای *انتامبا دیسپار* است. در عین حال، انجام مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی جهت تعیین زیرگونه‌های *انتامبا هیستولیتیکا* که بیماری مهاجم ایجاد می‌کنند و نیز تعیین فاکتورهای ویرولانس انگل، از اهمیت به‌سزایی برخوردار است (۷-۵). در این تحقیق، از ۲۷ نمونه مدفوع که از نظر میکروسکوپی، مشکوک به *انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبادیسپار* بودند، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به تعیین گونه انتامبا دیسپار، ۲۱ ایزوله (۱/۲۴٪)، قطعه‌ای حدود ۴۳۰bp را تکثیر کردند که همگی نشان‌دهنده الگوی انتامبا دیسپار بود، یک مورد (۰/۰۶٪) با پرایمر Hsp1+Hsp2 باند کمتر از ۴۰۰bp را نشان داد که *انتامبا هیستولیتیکا* شناسایی شد و ۵ نمونه (۰/۳٪) نیز تکثیر نیافتند که عدم تشخیص صحیح در آزمایش میکروسکوپی، تخریب DNA و احتمال وجود *انتاموبا موشکوفسکی* می تواند از دلایل آن باشد.

در بررسی سلیمی در زاهدان در سال ۱۳۸۴، از ۱۵۶۲ نمونه مورد بررسی، DNA هفت نمونه استخراج شد و در ۶ مورد، با PCR و پرایمرهای فوق، همگی *انتامبا دیسپار* شناسایی شدند (۷). بر اساس نتایج مطالعه هوشیار در ایران در سال ۱۳۸۱ در زمینه تشخیص افتراقی *انتامبا هیستولیتیکا* از *انتامبا دیسپار* (ایزوله‌های تهران) با روش PCR-RFLP، هشت ایزوله مورد بررسی، همگی الگوی *انتامبا دیسپار* را نشان دادند (۱۲). نتایج به دست آمده از این بررسی و مطالعات مولکولی در سال‌های اخیر، بیانگر این واقعیت می‌باشد که در ایران نیز مانند اکثر کشورها، *انتامبا دیسپار* گونهٔ غالب است (۱۴و۲۲).

نتایج مطالعات در ژاپن در سال ۲۰۰۰، فون غالب حاملین بدون علایم بالینی را *انتامبا هیستولیتیکا*، ولی در هلند، فون غالب را *انتامبا دیسپار* گزارش نموده است (۲۳و۲۴). نتایج تحقیقات هوشیار در ۱۳۸۱ در سه منطقه جغرافیایی ایران، میزان آلودگی به *انتامبا دیسپار* را ۹۲/۷ ٪ و *انتامبا هیستولیتیکا* را ۷/۳٪ گزارش نمود (۱۲). بر اساس نتایج مطالعات Clark در سال ۱۹۹۸ حتی در نقاط شیوع آمیبیازیس مهاجم، *انتامبا دیسپار*، گونه غالب بوده و نسبت شیوع، ۱۰ به ۱ است و تخمین می‌زنند ۹۰ ٪ عفونت‌ها به دلیل *انتامبا دیسپار* است (۲۵). بر اساس پیشنهاد سازمان جهانی بهداشت، درمان دارویی در موارد آلودگی به *انتامبا دیسپار* توصیه نمی‌شود (۵و۶) و فقط در موارد عفونت قطعی *انتامبا هیستولیتیکا* لازم است. لذا استفاده از روش‌های ملکولی جهت تشخیص افتراقی *انتامبا هیستولیتیکا* از *انتامبا دیسپار* و تشخیص دقیق بیماری و درمان دارویی جهت جلوگیری از مصرف بی‌رویه و غیر ضروری داروهای ضد تک یاخته و بروز مقاومت دارویی، الزامی است (۵و۶).

با PCR در لوکوس ۲- ۱ بین سویه‌های *انتامبا دیسپار* ایرانی مورد بررسی، از نظر اندازه تفاوت مشاهده گردید. در تحقیقی که توسط Zaki و همکاران در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت، پلی‌مورفیسم *انتامبا هیستولیتیکا* در دو لوکوس ۲-۱ و ۶-۵ بررسی شد. تغییرات قابل‌توجهی در اندازه و تعداد نواحی تکرارشونده در ژن، Zaki و همکارانش را متقاعد کرد که این دو ژن، از قدرت و پتانسیل مفیدی جهت بررسی پلی‌مورفیسم برخوردارند و حتی در افتراق انتامباهای مهاجم از غیر مهاجم نیز کمک‌کننده می‌باشند. Zaki در سال ۲۰۰۲، سویه‌های *انتامبا دیسپار* را نیز بررسی و مقایسه کرد و تغییرات ملاحظه‌شده در تحقیقات قبلی در استرین‌های *انتامبا هیستولیتیکا* در استرین‌های *انتامبا دیسپار* را نیز مشاهده نمود. تفاوت‌های قابل‌ملاحظه دیده شده، منجر به تمایز همزمان و تایپینگ این دو انگل شد (۳و۴). حقیقی و همکاران در سال ۲۰۰۲، پلی‌مورفیسم قابل‌توجهی از نظر طول، نوع و تعداد واحدهای تکراری در چهار ژن (لوکوس ۲-۱، ۶-۵، SREHP، و Chitinase) ایزوله‌های مختلف *انتامبا هیستولیتیکا* در مردان همجنس‌باز و عقب‌مانده‌های ذهنی از نواحی مختلف ژاپن را گزارش نمودند. آنها گزارش کردند که تعیین ژنوتیپ (Genotyping) زیرگونه‌های *انتامبا هیستولیتیکا* می‌تواند به تعیین تفاوت منشأ جغرافیایی زیرگونه‌ها و روش انتقال آنها کمک کند (۱و۲). ابتدا و انتهای ژن لوکوس ۲-۱ شامل نواحی ثابت و در بخش میانی این ژن، نواحی تکرارشونده ۸ تا ۱۲ نوکلئوتیدی است که این ناحیه در ایزوله‌های مختلف پلی‌مورف می‌باشد و حذف، تکرار و یا جابجایی محل بلوک‌های ژنی در ژن لوکوس ۲-۱، اساس بررسی پلی‌مورفیسم در این دو گونه می‌باشد. با بررسی توالی این سویه مشاهده گردید ایزوله ایرانی *انتامبا هیستولیتیکا*، با سویه KU20 که پیش از این در ژاپن گزارش گردیده بود مشابه است (۱و۲). البته به علت عدم جداسازی تعداد قابل‌توجهی *انتامبا هیستولیتیکا*، تفسیر خاصی از این شباهت و یا وجود تنوع ژنتیکی احتمالی در دیگر ایزوله ها نمی‌توان بیان کرد. در این مطالعه، ارتباط معنی‌داری مابین آلودگی با *انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار* با سن، جنس و ژنوتیپ انگل یافت نشد. همچنین ارتباط معنی‌داری مابین آلودگی با *انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار* با علایم گوارشی یافت نشد. با این وجود به نظر می‌رسد عامل

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 7:35 +0330 on Tuesday November 19th 2019

دیگری همچون ویروس‌ها و باکتری‌ها مانند روتاویروس، شیگلا، سالمونلا و اشرشیاکلی، مسبب علایم گوارشی می‌باشند. به هر حال، بررسی نقش تنوع ژنتیکی در ویرولانس *انتامبا هیستولیتیکا* در بنگلادش در سال ۲۰۰۱، وجود تنوع ژنتیکی در زیرگونه‌های *انتامبا هیستولیتیکا* در نواحی اندمیک را به دلیل پلی‌مورفیسم ژن SREHP گزارش نمود. جالب اینکه پلی‌مورفیسم زیرگونه‌های آمیبیازیس کبدی، متمایز از زیرگونه‌های روده‌ای بود (۱۷و۲۶و۲۷). توالی نوکلئوتیدهای ایزوله‌ها به GenBank، ارایه شده و تحت شماره‌های AB354125 و AB354132 قابل دستیابی است. تا قبل از این مطالعه، فقط یک نمونه از *انتاموبا دیسپار* با لوکوس ۱-۲ به GenBank با شماره AY058216 ارایه شده بود. با توجه به نتایج فوق، لزوم بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از ژن‌هایی که برای بررسی‌های اپیدمیولوژی مناسب هستند مانند ژن مورد مطالعه (لوکوس ۱-۲) در کنار تشخیص دقیق این دو تک‌یاخته احساس می‌شود تا الگوی انتقال این انگل در ایران، مشخص گردد (۲۸).

تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله از زحمات همکاران گرامی که در بیمارستان‌های تحت پوشش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در امر نمونه‌گیری به ما یاری رساندند، صمیمانه قدردانی می‌نمایند. همچنین از زحمات پرسنل محترم دایره تحقیقات بیماری‌های ناشی از غذا، بخصوص سرپرست آن دپارتمان آقای دکتر حسین دبیری تشکر می‌گردد.

REFERENCES

1. Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Nozaki T. Geographic Diversity among Genotyping of *Entamoeba histolytica* Field Isolates. J of Clin Microbiol 2003;41(8):3748-56.

2. Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi, Masuda, Nozaki. Remarkable Genetic Polymorphism among *Entamoeba histolytica* Isolates from a Limited Geographic Area. J of Clin Microbiol 2002;40(11):4081-90.

3. Zaki M, Clark C G. Isolation and Characterization of Polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica.* J of Clin Microbiol 2001;39:897-905.

4. Zaki M, Meelu P, Sun W, Clark CG. Simultaneous Differentiation and Typing of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. J of Clin Microbiol 2002;404:1271-76.

5. WHO/PAHO/UNESCO Report. A Consultation with Experts on Amoebiasis Mexico City, Mexico. Epidemiological Bulletin PAHO 1997;18(1):13-14.

6. WHO, Bulletin of the WHO, WHO News and activity; 1997;75(3):1-2.

7. Tanyuksel M, Petri W A. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. Clin Microbiol Rev 2003;164:713-26.

8. Clark C G, Diamond, L. S. *Entamoeba histolytica*: A method for Isolate Identification. Exp Parasitol 1993;77:450-55.

9. Clark C G. Methods for Investigation of Diversity in *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res. 2006;37(2):258-61.

10. Clark C G. Zaki M, Karim M.Ali. Genetic Diversity in *Entamoeba histolytica*. J Biosci 2002;27(6):603-7.

11. Ibne Karim M Ali, Zaki M, Clark CG. Use of PCR Amplification of tRNA Gene-Linked Short Tandem Repeats for Genotyping *Entamoeba histolytica.* J of Clin Microbiol 2005;43:5842-7.

12. Hooshyar H, Rezaian M, Kazemi B, Jeddi-Tehrani M, Solaymani-Mohammadi S. The Distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Northern, Central, and Southern Iran. Parasitol Res 2004;94:96-100.

13. Solaymani-Mohammadi S, Rezaian M, Babaei, Z, Rajabpour A, Meamar AR, Pourbabaei AA, et al. Comparison of a stool Antigen Detection Kit and PCR for Diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Infections in Asymptomatic Cyst Passers in Iran. Journal of Clinical Microbiology 2007;44(6):2258-61.

۱۴. سلیمی خراشاد علیرضا. بررسی میکروسکوپی و افتراق انتامبا هیسولیتیکا از انتامبا دیسپار با روش PCR در مراکز درمانی زاهدان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۱۳۸۴.

15. Nazemalhoseini Mojarad E, Haghighi A, Azimi Rad M, Mesgarian F, Rostami Nejad M, Zali MR. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Gonbad City, Iran. Iranian J Parasitol 2007;2(2):48-52.

16. Elham Razmjou, Ali Haghighi, Mostafa Rezaian, Seiki Kobayashi, Tomoyoshi Nozaki. Genetic Diversity of Glucose phosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica*. Parasitol Int 2006;55(4):307-11.

۱۷. راستی سیما. جداسازی و شناسایی ژن پروتوین غنی از سرین (SREHP) از سویه‌های انتامبا هیسولیتیکا و انتامبا دیسپار در ایران، پایان‌نامه دکترا. تهران: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۱۳۸۵.

18. Markell E K, John DT, Krotoski WA. Markell and Voge's Medical Parasitology. 8th ed. W.B Saunders Company: Philadelphia, USA; 1999.

19. Brown HW, Neva FA. Parasitologia Clinical. 5th ed. Mexico: Ed. Interamericana; 1993.

۲۰. حقیقی علی، رضائیان مصطفی. کشت و نگهداری انتامبا هیسولیتیکا در محیط سرم اسب رینگر و نشاسته برنج (HSr+s). مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۱۳۷۷؛ دوره پنجم، شماره ۲، صفحات ۶۰ الی ۶۴.

21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: NY; 2000. pp: 6.9 -6.10, 8.35-8.36, 1.123-1.125, 1.116-1.118.

۲۲. حقیقی علی، کشت آگزنیک انتامبا هیسولیتیکا و تهیه آنتی‌ژن پیکره‌ای و محلول برای روش‌های IFA و الیزا و کاربرد آن در تشخیص سرولوژی آمیبیازیس. پایان‌نامه دکترا، تهران: دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۷۸-۱۳۷۷.

23. Tachibana H. Asymptomatic Cyst Passer of *E. histolytica* but no *E. dispar* in Institution for Mentally Retarded in Japan. Parasitol Int 2000;49(1):31-35.

24. Verwieg JJ. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Cyst Using Polymerase Chain Reaction DNA Isolated from Faeces with Spin Columns. Eur J Clin Microbiol Infect 2000;19(5):3581-61.

25. Clark C G. Amoebic Disease. *Entamoeba dispar*, an Organism Reborn. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998;92:361-4.

26. Simonishvili S, Tsanava Sh, Chlikadze R. E. histolytica, The Serine-Rich Gene Polymorphism-Based Genetic Variability of Clinical Isolates from Georgia. Exp Parasitol 2005;110:313-17.

27. Ayeh-Kumi PF, Ali IK, Lochart LA, Gilchrist CA, Petri WA, Haque R. *Entamoeba histolytica*: Genetic Diversity of Clinical Isolates from Bangladesh as Demonstrated by Polymorphisms in the Serine-Rich Gene. Exp Parasitol 2001;99:80-8.

28. Nazemalhoseini Mojarad E, Rostami Nejad M, Haghighi A. Update of Knowledge for Best Amebiasis Management. Iranian J Gastroenterol and Hepatol 2008;1(1):45-50.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 7:35 +0330 on Tuesday November 19th 2019