Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 10:06 +0330 on Friday October 18th 2019

پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۷، صفحات ۲۸۵ تا ۲۸۷

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تمایز *انتاموبا هیستولیتیکا* و *انتاموبا دیسپار* با یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

احسان ناظم‌الحسینی مجرد[1*]، محمد رستمی‌نژاد[1]، معصومه عظیمی‌راد[1]، علی حقیقی[2]

[1]مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[2]گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: با اینکه تشخیص میکروسکوپی قادر نیست تک‌یاخته‌های مشابه نظیر *انتاموبا هیستولیتیکا/انتاموبا دیسپار* را از یکدیگر متمایز نماید، ولی هنوز تشخیص آمیبیازیس، مبتنی بر روش‌های میکروسکوپی است. لذا نیاز مبرمی برای ابداع و راه‌اندازی یک تکنیک ساده، ارزان و قابل اجرا در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به منظور شناسایی و افتراق این دو گونه وجود دارد.

روش بررسی: به منظور تعیین گونه ایزوله آمیب موجود در نمونه‌های مشکوک، اقدام به بررسی ملکولی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) گردید. برای افتراق همزمان این دو گونه، از یک جفت پرایمر pEd21/30 مربوط به ژن Peroxiredoxin استفاده شد. با انجام PCR بر روی DNA استخراج شده موارد مثبت *انتاموبا هیستولیتیکا* با این پرایمر باند زیر ۱۰۰ جفت باز را نشان داده و موارد مثبت انتاموبا دیسپار قطعه ای بالای ۱۰۰ جفت باز را تکثیر نمود.

یافته‌ها: دراین مطالعه از ۲۲ نمونه مثبت از نظر میکروسکوپی، در یک بیمار *انتاموبا هیستولیتیکا* مشاهده شد و بقیه نمونه‌ها (۲۱ نمونه)، همگی از نظر *انتامبا دیسپار* مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که با یک جفت پرایمر در تکنیک PCR می‌توان *انتاموبا هیستولیتیکا* و *انتامبا دیسپار* را تکثیر نمود که این روشی آسان‌تر و مقرون به صرفه جهت تشخیص و تمایز این دو گونه می‌باشد.

واژگان کلیدی: *انتاموبا هیستولیتیکا*، *انتاموبا دیسپار*، ژن Peroxiredoxin.

مقدمه

تک‌یاخته *انتاموبا هیستولیتیکا* (*Entamoeba histolytica*) با برآورد ۵۰ میلیون مورد آلودگی در سطح جهان و مرگ و میر سالیانه در حدود ۴۰,۰۰۰ تا ۱۰۰,۰۰۰ نفر یکی از مهمترین تک‌یاخته‌های بیماری‌زای انسان محسوب می‌شود. تا سال‌های اخیر چنین تصور می‌شد که گونه *انتاموبا هیستولیتیکا* احتمالاً ۱۰٪ از جمعیت جهان را آلوده می‌کند، ولی پذیرش *انتاموبا دیسپار* (*Entamoeba Dispar*) به عنوان گونه‌ای دیگر که مورفولوژی آن کاملاً شبیه *انتامبا هیستولیتیکا* می‌باشد ولی توانایی تهاجم به دستگاه گوارش انسان را ندارد، تغییرات عمیقی خصوصاً در مورد تشخیص و اپیدمیولوژی آمیبیازیس در جهان به وجود آورد. با توجه به اینکه اکثریت مبتلایان (حدود ۹۰٪) به گونه *انتامبا دیسپار* آلوده می‌شوند که در صورت تشخیص، نیازی به درمان ندارند، لذا افتراق صحیح این دو گونه بسیار حائز اهمیت است. بر اساس پیشنهاد سازمان بهداشت جهانی، درمان دارویی در موارد آلودگی به *انتاموبا دیسپار* توصیه نمی‌شود و فقط در موارد عفونت با *انتاموبا هیستولیتیکا* لازم است. با وجود اینکه روش‌های میکروسکوپی قادر به تمایز این دو تک‌یاخته نیستند و در بسیاری از نقاط دنیا تشخیص آمیبیازیس مبتنی بر شناسایی میکروسکوپی آنها در مدفوع می‌باشد، لذا نیاز شدیدی برای ابداع و راه‌اندازی یک تکنیک ساده، ارزان و قابل اجرا در آزمایشگاه‌های

***نویسنده مسئول مکاتبات:** احسان ناظم‌الحسینی مجرد؛ تهران، اوین، بیمارستان آیت ا... طالقانی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دایره تحقیقات بیماری‌های ناشی از غذا و اسهال مزمن (دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)؛ **پست الکترونیک:** ehsanmojarad@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱/۲۶
تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۸۷/۵/۱۵

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 10:06 +0330 on Friday October 18th 2019

تشخیص طبی به منظور شناسایی و افتراق این دو گونه وجود دارد (۱و۲). در این تحقیق با استفاده از یک جفت پرایمر و با توجه به تفاوت در اندازه قطعه تکثیر شده با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، این دو تک‌یاخته از هم جدا و متمایز شدند. لذا این روش به لحاظ استفاده از PCR، بسیار مقرون به صرفه است.

مواد و روش‌ها

نمونه مدفوع ۱۷۰۰ نفر از بیمارانی که به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مراجعه کردند مورد بررسی میکروسکپی (لام مستقیم و رنگ‌آمیزی تریکروم) قرار گرفت و DNA نمونه‌های مشکوک به *انتاموبا هستولیتیکا/انتاموبا دیسپار*، به وسیله کیت DNG-PLUS™ (ایران، شرکت سیناژن، Cat No. DN8118C) استخراج شد. به منظور افتراق همزمان گونه بیماری‌زا از غیر بیماری‌زا، بررسی ملکولی به روش PCR با استفاده از پرایمرهای pEd20/31 (جدول ۱) صورت گرفت. این پرایمرها که مربوط به ژن Peroxiredoxin می‌باشند به گونه‌ای طراحی شده‌اند که برای ایزوله‌های *انتاموبا هستولیتیکا*، باندی حدود 80-90 bp و برای *انتاموبا دیسپار* باندی حدود 110-120 bp ایجاد می‌کند. PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری با ترموسایکلر (Eppendorf AG 22331, Hamburg, Germany) با برنامه ذیل در ۳۵ سیکل صورت گرفت:

دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقه در ۹۴°c، دناتوراسیون ۳۰ ثانیه در ۹۴°c، آنیلینگ ۶۰ ثانیه در ۵۰°c، طویل‌شدن ۶۰ ثانیه در ۷۲°c، و طویل‌شدن نهایی ۵ دقیقه در ۷۲°c. محصول PCR متعاقب الکتروفورز روی ژل آگارز ۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید، با دستگاه UV Transluminator (Upland, CA, USA) مشاهده گردید (۳).

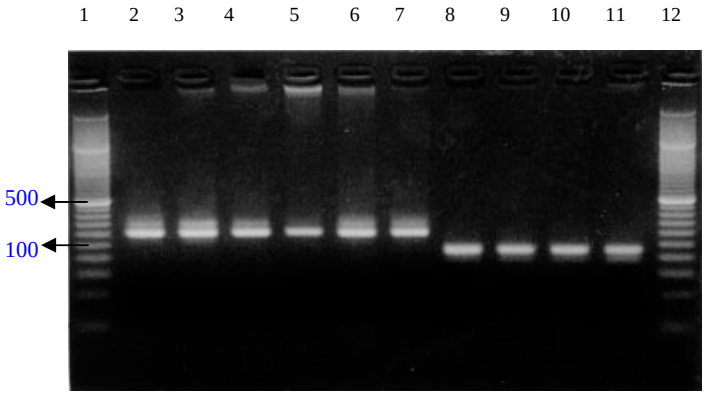
جدول۱) پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی

Primer name primer sequence 5` to 3`	
pEd 30 (Forward)	ATGTCCTGTAATCAACAAAAAGA
pEd 21 (Reverse)	TGTTGTTGTCCAAGAATTAAAG

یافته‌ها

از مجموع ۱۷۰۰ بیمار مورد بررسی، ۲۲ نمونه (۱/۳٪) از نظر *انتاموبا هیستولیتیکا* و *انتاموبا دیسپار*، مشکوک تشخیص داده شدند. ولی با مطالعه ملکولی، تنها یک بیمار (۰/۰۶٪) مبتلا به *انتاموبا هیستولیتیکا* بود و تعداد ۲۱ نمونه (۱/۲٪) *انتاموبا دیسپار* تشخیص داده شد. به منظور تأیید نتایج، نمونه‌ها با استفاده از دو جفت پرایمر از ژن لوکوس ۲-۱ تشخیص داده شدند. نتایج این مطالعه، میزان آلودگی به *انتاموبا دیسپار* را ۹۶٪ و *انتاموبا هیستولیتیکا* را ۴٪ گزارش نمود. درشکل شماره ۱ تعداد ۵ ایزوله مثبت *انتاموبا دیسپار* با این جفت پرایمر در کنار تنها گونه *انتاموبا هیستولیتیکا* با اندازه متفاوت متمایز شدند.

شکل ۱) الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ایزوله‌های ایرانی *انتاموبا هیستولیتیکا/انتاموبا دیسپار* بر روی ژل آگاروز ۲٪ با پرایمرهای pEd21/30



ستون ۱: مارکر ۲۰ جفت باز
ستون ۲: کنترل مثبت *انتاموبا دیسپار* (AS 16 IR)
ستون‌های ۳ الی ۷: پنج ایزوله *انتاموبا دیسپار*
ستون‌های ۸ الی ۱۰: یک ایزوله *انتاموبا هیستولیتیکا*
ستون ۱۱: کنترل مثبت *انتاموبا هیستولیتیکا* (HM-1:IMSS)
ستون ۱۲: مارکر ۲۰جفت باز

بحث

سازمان بهداشت جهانی توصیه می‌کند تحقیقات به سوی ایجاد و بهبود تکنیک‌های آزمایشگاهی برای تشخیص افتراقی *انتاموبا هیستولیتیکا* از *انتاموبا دیسپار* سوق داده شوند (۱). در این مطالعه، با استخراج مستقیم DNA از مدفوع سعی شد مرحله زمان‌بر کشت تک‌یاخته حذف شود. همچنین با استفاده از پرایمرهای pEd21/30 می‌توان با انجام PCR بر روی نمونه مشکوک بیماری‌زا یا غیر بیماری‌زا، ایزوله را مشخص کرد و در مجموع، روشی آسان و عملی جهت پاسخگویی سریع در آزمایشگاه‌ها راه‌اندازی نمود. در مطالعه حاضر، گونه بیماری‌زای *انتاموباهیستولیتیکا* با اختلاف اندازه در محصول PCR ژن

Peroxiredoxin (۳) بـــه خـــوبی و ســـادگی از گونـــه غیـــر بیماری‌زای *انتامبا دیسپار* متمایز گردید.

بر اساس نتایج مطالعات صورت‌گرفتـه، حتـی در نقـاط شـیوع آمیبیازیس نیز *انتاموبا دیسپار*، گونه غالب اسـت. همچنـین در مطالعه‌ای که در نقاط مختلـف ایـران صـورت گرفـت، ۹۲/۱٪ موارد آلودگی *انتاموبا دیسپار* و ۷/۹ درصد *انتاموبا هیستولیتیکا* یا آلودگی توأم به هر دو گونه گزارش شـده اسـت. نتـایج ایـن مطالعه با اپیدمیولوژی این انگل در جهـان و ایـران همخـوانی دارد (۲). اهمیـت موضـوع از ایـن قـرار اسـت کـه بـر اسـاس پیشنهاد سازمان بهداشـت جهـانی، درمـان دارویـی در مـوارد آلودگی به *انتاموبا دیسپار* توصیه نمـی‌شـود و فقـط در مـوارد عفونت قطعی *انتاموبـا هیـستولیتیکا*، بـه درمـان دارویـی نیـاز می‌باشد (۱)، لذا استفاده از روش‌های ملکـولی سـریع و سـاده جهت تشخیص افتراقی *انتاموبا هیستولیتیکا* از *انتاموبا دیـسپار* وتـشخیص دقیـق بیمـاری و درمـان دارویـی مناسـب جهـت جلوگیری از مـصرف بـی‌رویـه و غیـر ضـروری داروهـای ضـد تک‌یاخته و بروز مقاومت دارویی، الزامی است.

تشکر و قدردانی

نویـسندگان ایـن مقالـه، مراتـب تـشکر و قـدردانی خـود را از زحمات استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمدرضا زالی، رئیس محترم مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ابراز می‌دارند.

REFERENCES

1. WHO/PAHO/UNESCO Report. A consultation with experts on Amoebiasis Mexico city, Mexico. Epidemiological Bulletin PAHO 1997; 18(1):13-14.

2. Nazemalhosseini Mojarad E, Rostami Nejad M, Haghighi A. Update of knowledge for best Amebiasis Management. Iranian J Gastroenterol and Hepatol 2008; 1(1):45-50.

3. Tachibana H, Cheng XJ. Entamoeba dispar: Cloning and Characterization of Peroxiredoxin Genes.Experimental Parasitology 2000;94: 51–5.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 10:06 +0330 on Friday October 18th 2019