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 بـه روش واکـنش زنجیـره‌ای 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 بـاز را نـشان داده و مـوارد مثبت انتاموبا دیسپار قطعه ای بالای ۱۰۰ جفـت باز را تکثیر نمود.

یافته‌ها: دراین مطالعه از ۲۲ نمونه مثبت از نظر میکروسکوپی، در یک بیمار *انتاموبا هیستولیتیکا* مشاهده شـد و بقیـه نمونـه‌هـا (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 نمـود کـه 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 هیـستولیتیکا* (*Entamoeba histolytica*) بـا برآورد ۵۰ میلیون مورد آلودگی در سطح جهان و مرگ و میـر سالیانه در حدود ۴۰،۰۰۰ تا ۱۰۰،۰۰۰ نفر یکـی از مهمتـرین تک‌یاخته‌های بیماری‌زای انسان محسوب می‌شود. تا سال‌هـای اخیر چنین تصور می‌شد که گونه *انتاموبا هیستولیتیکا* احتمالاً ۱۰٪ از جمعیت جهان را آلوده می‌کند، ولـی پـذیرش *انتاموبا دیسپار* (*Entamoeba Dispar*) بـه عنـوان گونـه‌ای دیگـر کـه مورفولوژی آن کاملاً شبیه *انتامبا هیستولیتیکا* مـی‌باشـد ولـی توانایی تهاجم به دسـتگاه گـوارش انـسان را نـدارد، تغییـرات عمیقی خصوصاً در مورد تشخیص و اپیـدمیولوژی آمیبیـازیس در جهان به وجود آورد. با توجه بـه اینکـه اکثریـت مبتلایـان (حدود ۹۰٪) به گونه *انتامبا دیـسپار* آلـوده مـی‌شـوند کـه در صورت تشخیص، نیازی به درمان ندارند، لذا افتراق صحیح این دو گونه بسیار حائز اهمیت است. بر اسـاس پیـشنهاد سـازمان بهداشت جهانی، درمان دارویی در مـوارد آلـودگی بـه *انتاموبا دیسپار* توصیه نمی‌شود و فقـط در مـوارد عفونـت بـا *انتاموبا هیستولیتیکا* لازم است. با وجود اینکه روش‌های میکروسکوپی قادر به تمایز این دو تک‌یاخته نیستند و در بـسیاری از نقـاط دنیا تشخیص آمیبیازیس مبتنـی بـر شناسـایی میکروسـکوپی آنها در مدفوع می‌باشد، لذا نیاز شدیدی برای ابداع و راه‌اندازی یـک تکنیـک سـاده، ارزان و قابـل اجـرا در آزمایـشگاه‌هـای

***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 on 2026-11-18]

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 *انتامبا هستولیتیکا*/*انتامبا 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 *انتامبا هستولیتیکا*، باندی حدود 80-90 bp و برای *انتامبا 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).

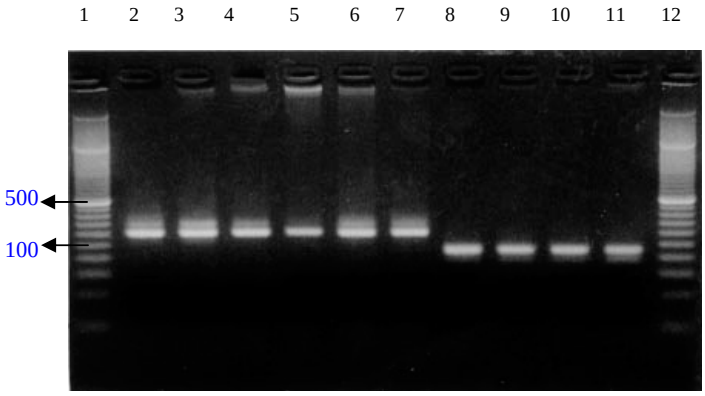
جدول۱) پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی

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 *انتامبا هیستولیتیکا* و *انتامبا دیسپار*، مشکوک تشخیص داده شدند. ولی با مطالعه ملکولی، تنها یک بیمار (۰/۰۶٪) مبتلا به *انتامبا هیستولیتیکا* بود و تعداد ۲۱ نمونه (۱/۲٪) *انتامبا 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 *انتامبا دیسپار* را ۹۶٪ و *انتامبا هیستولیتیکا* را ۴٪ گزارش نمود. درشکل شماره ۱ تعداد ۵ ایزوله مثبت *انتامبا دیسپار* با این جفت پرایمر در کنار تنها گونه *انتامبا هیستولیتیکا* با اندازه متفاوت متمایز شدند.

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



ستون ۱: مارکر ۲۰ جفت باز
ستون ۲: کنترل مثبت *انتامبا دیسپار* (AS 16 IR)
ستون‌های ۳ الی ۷: پنج ایزوله *انتامبا دیسپار*
ستون‌های ۸ الی ۱۰: یک ایزوله *انتامبا هیستولیتیکا*
ستون ۱۱: کنترل مثبت *انتامبا 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 *انتامبا هیستولیتیکا* از *انتامبا 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 *انتامبا‌هیستولیتیکا* با اختلاف اندازه در محصول PCR ژن

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-18]

Peroxiredoxin (۳) بـه خـوبی و سـادگی از گونـه غیـر 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 on 2026-11-18]