

تمایز انتاموبا هیستولیتیکا و انتاموبا دیسپار با یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

احسان ناظم‌الحسینی مجرد^{۱*}، محمد رستمی نژاد^۱، معصومه عظیمی‌راد^۱، علی حقیقی^۲

^۱مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
^۲آگروه 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: در این مطالعه از ۲۲ نمونه مثبت از نظر میکروسکوپی، در یک بیمار *انتاموبا هیستولیتیکا* مشاهده شد و بقیه نمونه‌ها (۲۱ نمونه)، همگی از نظر *انتاموبا دیسپار* مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که با یک جفت پرایمر در تکنیک PCR می‌توان *انتاموبا هیستولیتیکا* و *انتاموبا 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

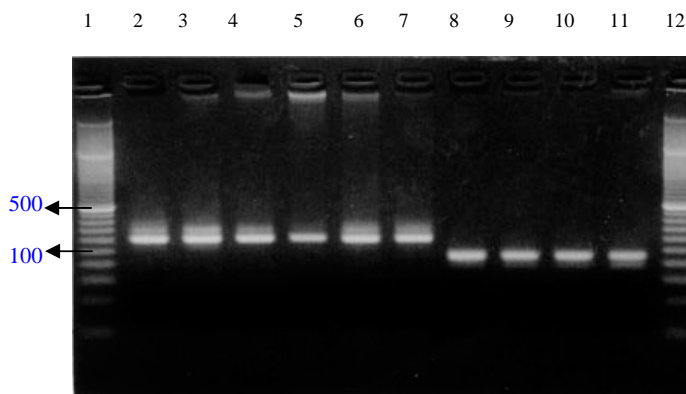
توانایی تهاجم به دستگاه گوارش انسان را ندارد، تغییرات عمیقی خصوصاً در مورد تشخیص و اپیدمیولوژی آمیبیازیس در جهان به وجود آورد. با توجه به اینکه اکثریت مبتلایان (حدود ۹۰٪) به گونه *انتاموبا دیسپار* آلوده می‌شوند که در صورت تشخیص، نیازی به درمان ندارند، لذا افتراق صحیح این دو گونه بسیار حائز اهمیت است. 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

تک‌یاخته *انتاموبا هیستولیتیکا (Entamoeba histolytica)* با برآورد ۵۰ میلیون مورد آلودگی در سطح جهان و مرگ و میر سالانه 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 *انتاموبا هیستولیتیکا* می‌باشد ولی

*نویسنده مسئول مکاتبات: احسان ناظم‌الحسینی مجرد؛ تهران، اوین، بیمارستان آیت الله 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

انتاموبیا هیستولیتیکا بود و تعداد ۲۱ نمونه (۱/۲) انتاموبیا 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 انتاموبیا دیسپار را ۹۶٪ و انتاموبیا هیستولیتیکا را ۴٪ گزارش نمود. در شکل شماره ۱ تعداد ۵ ایزوله مثبت انتاموبیا دیسپار با این جفت پرایمر در کنار تنها گونه انتاموبیا هیستولیتیکا با اندازه متفاوت متمایز شدند.

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



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

بحث

سازمان بهداشت جهانی توصیه می‌کند تحقیقات به سوی ایجاد و بهبود تکنیک‌های آزمایشگاهی برای تشخیص افتراقی انتاموبیا هیستولیتیکا از انتاموبیا 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 انتاموبیا هیستولیتیکا با اختلاف اندازه در محصول PCR ژن

تشخیص طبی به منظور شناسایی و افتراق این دو گونه وجود دارد (۲ و ۱). در این تحقیق با استفاده از یک جفت پرایمر و با توجه به تفاوت در اندازه قطعه تکثیر شده با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (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 میکروسکوپی (لام مستقیم و رنگ‌آمیزی تریکروم) قرار گرفت و DNA نمونه‌های مشکوک به انتاموبیا هیستولیتیکا/انتاموبیا 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 انتاموبیا هیستولیتیکا، باندی حدود 80-90 bp و برای انتاموبیا 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:

دنا تورا سیون اولیه ۵ دقیقه در ۹۴°C، دنا تورا سیون ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، آنیلینگ ۶۰ ثانیه در ۵۰°C، طویل شدن ۶۰ ثانیه در ۷۲°C و طویل شدن نهایی ۵ دقیقه در ۷۲°C. محصول PCR متعاقب الکتروفورز روی ژل آگارز ۲٪ حاوی اتیدیم بروماید، با دستگاه UV Transluminator (Upland, CA, USA) مشاهده گردید (۳).

جدول ۱) پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی

Primer name primer sequence 5' to 3'	
pEd 30 (Forward)	ATGTCCTGTAATCAACAAAAAGA
pEd 21 (Reverse)	TGTTGTTGTCCAAGAATTAAG

یافته‌ها

از مجموع ۱۷۰۰ بیمار مورد بررسی، ۲۲ نمونه (۱/۳) از نظر انتاموبیا هیستولیتیکا و انتاموبیا دیسپار، مشکوک تشخیص داده شدند. ولی با مطالعه ملکولی، تنها یک بیمار (۰/۰۶) مبتلا به

می‌باشد (۱)، لذا استفاده از روش‌های ملکولی سریع و ساده جهت تشخیص افتراقی *انتاموبا هیستولیتیکا* از *انتاموبا دیسپار* و تشخیص دقیق بیماری و درمان دارویی مناسب جهت جلوگیری از مصرف بی‌رویه و غیر ضروری داروهای ضد تک‌یاخته و بروز مقاومت دارویی، الزامی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود 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.

Peroxiredoxin (۳) به خوبی و سادگی از گونه غیر بیماری‌زای *انتاموبا دیسپار* متمایز گردید. بر اساس نتایج مطالعات صورت گرفته، حتی در نقاط شیوع آمیبیازیس نیز *انتاموبا دیسپار*، گونه غالب است. همچنین در مطالعه‌ای که در نقاط مختلف ایران صورت گرفت، ۹۲/۱٪ موارد آلودگی *انتاموبا دیسپار* و ۷/۹ درصد *انتاموبا هیستولیتیکا* یا آلودگی توأم به هر دو گونه گزارش شده است. نتایج این مطالعه با اپیدمیولوژی این انگل در جهان و ایران همخوانی دارد (۲). اهمیت موضوع از این قرار است که بر اساس پیشنهاد سازمان بهداشت جهانی، درمان دارویی در موارد آلودگی به *انتاموبا دیسپار* توصیه نمی‌شود و فقط در موارد عفونت قطعی *انتاموبا هیستولیتیکا*، به درمان دارویی نیاز

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.