مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی
دوره ۴ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۵ ، صفحات : ۳۸-۳۳

تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار وبررسی انگل های روده ای در مناطق روستایی اهواز وحمیدیه

دکتر مصطفی رضاییان : استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر حسین هوشیار: استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران – نویسنده رابط : hooshyar4@yahoo.com
دریافت : ۱۳۸۴/۱۲/۲۰ پذیرش : ۱۳۸۵/۳/۱۶

چکیده:

زمینه و هدف :تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار از لحاظ بالینی ومطالعات اپیدمیولوژی دارای اهمیت میباشد. این دو انگل اگرچه از نظر مرفولوژیی کاملا مشابه اند اما ازنظر خصوصیات ژنتیکی،بیوشیمیایی و بیماریزایی کاملا متفاوتند.به منظور افتراق این دو انگل از یکدیگر وتعیین فراوانی نسبی هر کدام از آنها، این بررسی ،روی ساکنان مناطق روستایی اهواز وحمیدیه صورت گرفت.

روش کار: این بررسی به روی نمونه مدفوع ۷۸۲ نفر با دو روش مستقیم وفرمالین اترصورت گرفت. همچنین ۲۱نمونه آلوده به انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار با موفقیت در محیط کشت رابینسون تکثیر داده شد و پس از استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم ، نمونه ها با روش PCR-RFLP و با استفاده از آنزیم HinfI تعیین هویت شد.

نتایج:۷۵/۱٪ ازافراد مورد بررسی، حداقل به یکی از انگل های روده ای آلوده بودند.بالاترین میزان آلودگی مربوط به انتامبا کلی (۵۱/۹٪) وکمترین میزان ، مربوط به دی انتامبا فراژیلیس(۰/۷۶٪) ود.۶۵نفر(۸/۳٪) به انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار آلوده بودند.
نتایج PCR-RFLPروی ۲۱ نمونه و مقایسه این نمونه ها با نمونه های استاندارد نشان دادکه ۱۹ (۹۰/۴۸٪)نمونه انتامبا دیسپار، ۱نمونه (۴/۷۶٪)انتامبا هیستولیتیکا و۱ نمونه آلودگی توام با هر دو انگل بود.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد اکثر موارد آلودگی به کیست های انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار در منطقه مورد بررسی، مربوط به انتامبا دیسپار می باشد.

واژگان کلیدی: انتامبا هیستولیتیکا، انتامبا دیسپار، انگل های روده ای، اهواز

مقدمه:

آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار، یکی از شایع ترین عفونت های تک یاخته ای در جهان می باشد.تخمین زده شده که حدود۵۰۰ میلیون نفر درسرتاسرجهان به این انگل آلوده می باشندو هرسال در حدود ۱۰۰ هزار نفر به علت ابتلا به آمیبیاز روده ای وخارج روده ای فوت می کنند(WHO 1997).در طی دو دهه گذشته ثابت شد که تک یاخته ای که قبلا به عنوان انتامبا هیستولیتیکا شناخته می شد، در واقع متشکل از دو گونه مجزا می باشد.یک گونه بالقوه بیماریزا است که انتامبا هیستولیتیکا نامیده می شود وگونه دیگر ،که به نام انتامبا دیسپار نامیده شد، کاملا غیر بیماریزا وبا انسان حالت هم سفرگی دارد(Diamond L.S. and Clark C.G. 1993). این دو گونه از نظر مرفولوژیی کاملا شبیه یکدیگر هستند وبا میکروسکپ نوری افتراق آنها امکانپذیر نمی باشد ،اما تفاوت های ژنتیک،ایمنولوژیک،بیوشیمیایی و

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-24]

رفتار زیست شناختی آنهاسبب می شود تا در حال حاضر با بعضی روش های پیچیده وپر هزینه، نظیر مقایسه الگوی حرکت الکتروفورزی ایزوآنزیم ها (Sargeaunt P.G. et al. 1978)، استفاده ازآنتی بادیهای منوکلنال (Haque R. et al. 1994) و نیز استفاده از روش های ملکولی نظیرPCR ، بتوان این دو انگل رااز همدیگر افتراق داد (Tachibana H. et al. 1992). مطالعات انجام شده نشان می دهد که قسمت اعظم موارد آلودگی در جهان مربوط به انتامبا دیسپار می باشد و آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا فقط ۱۰٪ از کل آلودگی را (یعنی حدود ٤٠-٥٠ میلیون نفر) تشکیل می دهد(Tanyuksel M. and Petri W.A. 2003). انتامبا هیستولیتیکا در یک دهم افراد آلوده به علل مختلف، حالت تهاجمی می یابد و بیماریزا می گردد.این امر منجر به حدود ۱۰۰هزار مورد مرگ ومیردر سال به علت آمیبیاز می گردد که بعد ازمالاریا، دومین بیماری تک یاخته ای کشنده انسان در جهان محسوب می شود (WHO 1997).

در نشست علمی خبرگان سازمان جهانی بهداشت که در سال ۱۹۹۷ در مکزیکوسیتی تشکیل گردید، ضمن تایید مجزا بودن دو گونه انتامبا هیستولیتیکا وانتامبا دیسپار ،توصیه گردید که در کشور های مختلف جهان به منظور ارائه آمار صحیح از شیوع آلودگی ، مطالعات جدید بر اساس افتراق این دو گونه از یکدیگرصورت گیرد تا کانون های واقعی آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا شناسایی گردند (WHO 1997).این مطالعات همچنین می تواند مبنایی برای ابداع یک روش ساده آزمایشگاهی جهت شناسایی این دو انگل در آزمایشگاههای تشخیص طبی باشد.

از آنجا که در ایران مطالعات زیادی در این موضوع صورت نگرفته واطلاع دقیقی در زمینه این دو انگل وجود ندارد، بررسی حاضردر راستای هدف فوق و با روش PCR-RFLP انجام پذیرفت.باتوجه به اینکه روش های مبتنی بر شناسایی تفاوت های موجود در سکانس نکلئوتیدها در ژنهای مختلف،روشی بسیار دقیق می باشد واز طرفی ، این تفاوت در ژنهای مختلف انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار از ۲٪ تا بیش از ۱۷٪ گزارش شده است (Clark C.G. and Diamond L.S. 1991;Tannich E.1998) روش های ملکولی از جمله روش PCR روشی مناسب و دقیق برای تشخیص افتراقی این دو انگل محسوب می گردند.

روش کار:

الف) نمونه گیری: این بررسی یک مطالعه مقطعی است که با روش نمونه گیری تصادفی از حدود ۱۰۰۰ نفر جمعیت ساکن در مناطق مختلف روستایی اهواز وحمیدیه صورت گرفت. بعد از توضیحات و جلب موافقت افراد،باپخش قوطی های یکبارمصرف پلاستیکی در مجموع۷۸۲ نمونه مدفوع از افراد سنین مختلف ودر دو جنس مذکر ومونث جمع آوری وبه آزمایشگاه مرکز آموزش وتحقیقات بهداشتی اهواز انتقال داده شد.نمونه ها با دو روش فرمالین اتر (Garcia L.S. 2001)و تهیه گسترش مستقیم با سرم فیزیولوژی مورد بررسی انگل شناسی قرارگرفت .

ب) کشت نمونه ها واستخراج DNA : نمونه های محتوی کیست های انتامباهیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار در محیط کشت سرم منعقد شده اسب(حقیقی و رضائیان ۱۳۷۸) ومحیط رابینسون (Robinson G.L. 1968) کشت و پس از تبدیل به ترفوزوئیت، جهت تکثیرانبوه در محیط رابینسون پاساژ داده شد. پس از سه بار پاساژ و ازدیاد ترفوزوئیت ها،محتویات محیط کشت جمع آوری و سه بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد ،رسوب محتوی حداقل یک میلیون ترفوزوئیت به لوله های اپندورف انتقال یافت وتا هنگام استخراج DNA در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم طبق روش Sambrook و همکاران (Sambrook J. et al. 1989) استخراج شد. به رسوب محتوی انگل، ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده STE ، ۲٪ SDS و۳میکرولیترپروتئینازK افزوده و به مدت ۳ ساعت در بن ماری $60^{o}C$ قرار داده شد، سپس محلول حاصل

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-24]

۱۰دقیقه جوشانده شدو DNA با محلول فنل-کلروفرم-ایزومیل الکل استخراج وبااستفاده ازالکل اتیلیک مطلق ونمک سدیم استات ۰/۳ ٪ رسوب داده شد. پس از آن نمک های اضافی با الکل ۷۰٪شستشو وDNA بدست آمده پس از خشک شدن، در ۵۰ میکرولیترآب مقطر دو بار تقطیر ،حل ودردمای C^{o} ۲۰- ذخیره گردید .

ج) انجام PCR و هضم آنزیمی :

جهت انجام PCR از پرایمرهای P1وP4 طراحی شده توسط Tachibana وهمکاران (Tachibana H. et al. 1992) با سکانس :

TAA	AGC	ACC	5′ P1
3′ AGC	ATA	TTG	TC
TTA	ATT	CCA	5′ P4
3′ TCT	GGT	GTT	GG

استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر ودر ۳۵ چرخه به شرح زیر انجام گرفت :

دناتوراسیون اولیه:۹۴ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه و مراحل زیر برای ۳۵ چرخه انجام شد.

دناتوراسیون:۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه،

اتصال: ٥٤/٥ درجه سانتی گراد به مدت ٤٥ ثانیه،

تکثیر:۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه،

در چرخه نهایی ، یک مرحله تکثیر نهایی (Final extension) در۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام می‌شد.

۱۰ میکرولیتر از محصول PCR برروی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شدو پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، باند نواری بدست آمده که با دستگاه UV Transilluminator در طول موج٢٥٤ نانومتر در کنار مارکر ونمونه استاندارد مشاهده گردید.برش آنزیمی به مدت ۲ ساعت بااستفاده از آنزیم HinfI در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شدوقطعات حاصل از برش آنزیمی روی ژل آگاروز ۲٪ ، پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در کنار مارکر وبانمونه های استاندارد مقایسه گردید.در این بررسی ازسوش HM1:IMSS انتامبا هیستولیتیکا وسوش AS2IR انتامبا دیسپار به عنوان نمونه استاندارد استفاده شد.

نتایج :

در مجموع ۷۸۲ نمونه مدفوع مورد بررسی قرار گرفت. ۵۷۸ نفر(۷۵/۱٪)دارای آلودگی به حداقل یک نوع انگل بودند و۱۹۵ نفر(۲٤/۹٪)فاقد هرگونه آلودگی انگلی بودند.میزان آلودگی به تک یاخته ها وکرم های روده ای عبارت بود از : انتامبا کلی ۴۰۶ مورد(۵۱/۹٪) ،ژیاردیا لامبلیا۱۸۴ مورد(۲۳/۵٪) ،یدامبا بوچلی ۱۹۲مورد(۲٤/٦٪) ،انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار۶۵مورد(۸/۳٪)،انتامبا هارتمانی ۵۰مورد(٦/٤٪) ،کیلوماستیکس مسنیلی ۵۳مورد(٦/۸٪) ،اندولیماکس نانا۲۳مورد(۲/۹٪) ،دی انتامبا فراژیلیس ۶ مورد(۰/۷٦ ٪) ،هیمنولپیس نانا۹۱مورد(۱۱/٦٪)،استرونژیلوئیدس استرکورالیس ۱۵مورد(۱/۹٪) ،اکسیور۱۲مورد(۱/۵٪) (جدول شماره ۱).

از ٦٥ مورد انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار که در محیط رابینسون کشت داده شد ، ۲۱مورد(۳۲/۳٪) در محیط کشت استقرار وتکثیر انبوه یافتند.تشخیص افتراقی این ترفوزوئیت ها با روش PCR-RFLP با استفاده از پرایمرهای P1+P4 و برش آنزیمی با آنزیم HinfI صورت گرفت. محصول PCR با پرایمرهای فوق ، یک باندنواری حاوی ۵۳۱ جفت نکلئوتید است که پس از برش آنزیمی برای نمونه استاندارد انتامبا هیستولیتیکا، دو نوار ۳٤۰ و ۱۹۱جفت نوکلئوتیدی و برای نمونه استاندارد انتامبا دیسپار، ۳ نوار ٦۷ ، ۱۹۱ ، ۲۷۳ جفت نوکلئوتیدی ایجاد می کند(تصویر۱). از ۲۱ نمونه مورد بررسی ، پس از تشخیص افتراقی ،۱۹نمونه (۹۰/٤۸٪) الگوی انتامبا دیسپار ،۱نمونه (٤/۷٦٪) الگوی انتامبا هیستولیتیکاو ۱نمونه(٤/۷٦٪) الگوی آلودگی توام باهردو انگل را نشان داد(تصویر۱).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-24]

بحث :

تفکیک انتامباهیستولیتیکا به دو گونه مجزا از هم، بدون شک یکی از بزرگترین و مهمترین پیشرفت‌ها و تغییرات ایجاد شده در زمینه تک‌یاخته‌های روده‌ای طی دو دهه گذشته می‌باشد. دلایل مطرح شده ژنتیک، بیوشیمیایی، بیولوژیک و ایمنولوژیک برای مجزا بودن این دو گونه بقدری محکم و مستدل است که در سال ۱۹۹۳ تعریف مجددی از انتامباهیستولیتیکا توسط دیاموند و گراهام‌کلارک به عمل آمد(Diamond L.S. and Clark C.G. 1993) و وجود انتامبا دیسپار رسماً پذیرفته شد.

شناسایی و افتراق انتامباهیستولیتیکا از انتامبا دیسپار از لحاظ بالینی و اپیدمیولوژی بسیار حائز اهمیت است. انتامبا دیسپار اگرچه از نظر مرفولوژیک کاملاً شبیه انتامبا هیستولیتیکا می‌باشد ، ولی هیچگونه رفتار تهاجمی ندارد و در واقع یک آمیب هم سفره روده انسان می‌باشد که هیچگونه احتیاجی به درمان ندارد. تشخیص افتراقی این دو آمیب باعث می‌شود سالیانه مقادیر بسیار قابل توجهی از مصرف داروهای ضد آمیب خصوصاً درکشورهایی که انتامبا دیسپار فون انگلی غالب است کاسته شود که نه تنها از نظر اقتصادی قابل توجه است، بلکه می‌تواند از بروز عوارض جانبی زیادی که بعضی از این داروها دارند، جلوگیری کند (WHO 1997). کاهش مصرف دارو و عدم استفاده از آن در عفونت های ناشی از انتامبادیسپار می‌تواند در این زمینه نیز کمک موثری باشد.

تشخیص افتراقی این دو آمیب از لحاظ اپیدمیولوژی نیز می‌تواند تغییرات زیادی را سبب شود. آمارهایی که در زمینه اپیدمیولوژی آمیبیاز در دسترس می‌باشد و تاکنون جمع‌آوری شده همگی آمارهایی هستند که نشان‌دهنده وضعیت آلودگی افتراق نیافته و توأم انتامباهیستولیتیکا و انتامبادیسپار می‌باشند. این اطلاعات، اگر بر مبنای شناسایی افتراقی این دو گونه از یکدیگر جمع‌آوری شوند، باعث خواهند شد تا کانونهای واقعی آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا شناسایی شوند و برنامه‌های بهداشتی و تحقیقاتی کشورها اختصاصاً در آن کانونها به اجرا در آیند.بررسی حاضر نشان داد که در منطقه مورد مطالعه قسمت اعظم موارد آلودگی به کیست های ٤ هسته ای را انتامبا دیسپار تشکیل می دهد(۹۰٪) که با الگوی جهانی پراکندگی آلودگی به این انگل همخوانی دارد. به عنوان مثال در بررسی انجام شده در مناطق روستایی استان Shandnog چین ، ۷۸/۱٪ موارد را انتامبا دیسپار و۱۸/۸٪ را انتامبا هیستولیتیکا و۳/۱٪ را آلودگی توام تشکیل داده است (Guo Z.Z. et al. 1995) ویا در فیلیپین ۱۹ مورد کیست مورد بررسی قرار گرفته که همگی الگوی انتامبا دیسپار را نشان دادند (Rivera W. L. 1996). در بررسی انجام شده در اتیوپی روی ۲۹ نمونه،۲۷ مورد(۹۳/۱٪) الگوی انتامبا دیسپار و ۲ مورد(٦/۹٪) الگوی انتامبا هیستولیتیکا نشان دادند (Gatti S. et al. 1998). در ایران مطالعات اندکی راجع به نسبت آلودگی این دو انگل صورت گرفته است.در یک بررسی روی ۸ نمونه جدا شده در آزمایشگاههای تشخیص طبی تهران که با روشPCR مورد بررسی قرار گرفتند هر ۸ نمونه الگوی انتامبا دیسپار را نشان دادند (هوشیار وهمکاران۱۳۸۱). همچنین ،هر۴ مورد انگل جدا شده از مراجعان به بیمارستان طالقانی تهران که با روش PCR مورد بررسی قرار گرفته شد، انتامبا دیسپار بود (راستی وهمکاران ۱۳۸٤). لازم به یاد آوری است که با توجه به خصوصیات بیولوژی،کشت آمیب ها همواره با موفقیت کامل همراه نمی باشد ودر بهترین شرایط حدود ۶۰٪ مباشد (حقیقی و همکاران ۱۳۷۸)،در این بررسی نیز ۲۱ مورد (۳۲/۳٪) از نمونه کشت موفقیت آمیز داشتند.

نتیجه گیری :

با توجه به مطالعات فوق و بررسی حاضر بنظر می رسد در مناطق مرکزی ایران وفور انتامبا هیستولیتیکا نسبت به مناطق جنوبی بسیار کمتر باشد .اما اظهار نظر قطعی در این زمینه، بررسی ومطالعات بیشتری را می طلبد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-24]

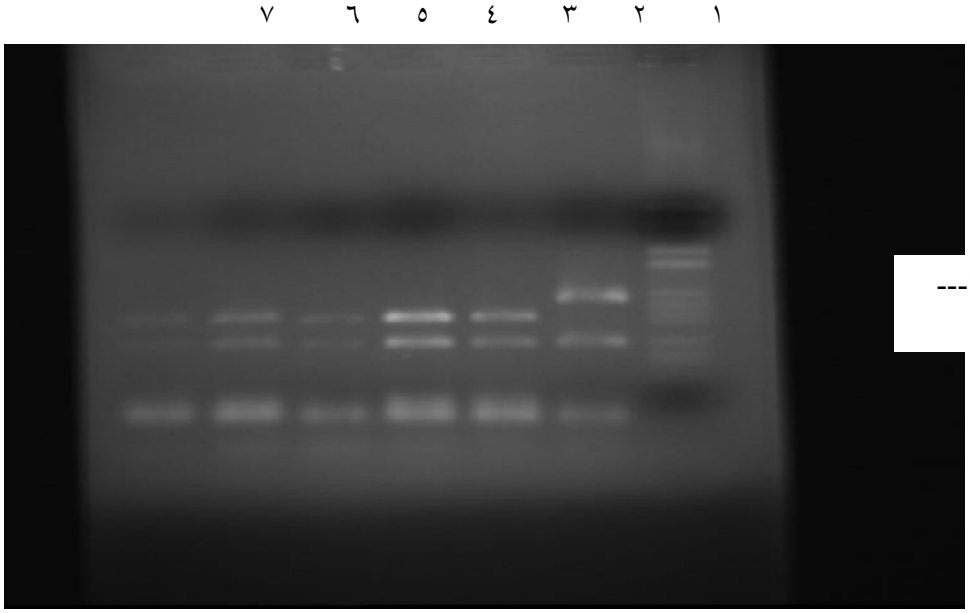
تشکر وقدردانی :

این پژوهش با حمایت مالی قطب علمی انیستیتو تحقیقات بهداشتی ،دانشگاه علوم پزشکی تهران (طرح تحقیقاتی شماره ۲٤۱/۸۲/۵۹)انجام گردیده است .

همچنین نویسندگان مقاله از همکاری کارمندان محترم مرکز آموزش وتحقیقات اهواز ونیز اززحمات خانم فرنیا وخانم بابایی و آقای شهرام سلیمانی شاغل در آزمایشگاه تک یاخته های روده ای تشکر و قدردانی می کنند.

جدول ۱- شیوع آلودگی به انگل های روده ایی در ۷۸۲ نفر مورد بررسی در مناطق روستایی اهواز وحمیدیه

نوع آلودگی	تعداد	درصد
انتامبا کلی	٤۰٦	۵۱/۹
انتا مبا هیستولیتیکا/دیسپار	٦۵	۸/۳
ژیاردیا لامبلیا	۱۸٤	۲۳/۵
یدامبا بوچلی	۱۹۲	۲٤/٦
انتامبا هارتمانی	۵۰	٦/٤
اندولیماکس نانا	۲۳	۲/۹
کیلوماستیکس مسنیلی	۵۳	٦/۸
دی انتامبا فراژیلیس	٦	۰/۷٦
هیمنولپیس نانا	۹۱	۱۱/٦
استرنژیلوئیدس استر کورالیس	۱۵	۱/۹
اکسیور	۱۲	۱/۵
فاقد آلودگی	۱۹۵	۲٤/۹
کل موارد آلودگی	۵۸۷	۷۵/۱



۱: مارکر ۲: استاندارد انتامبا هیستولیتیکا ۳: استاندارد انتامبا دیسپار ۷-٤ : نمونه ها

تصویر ۱- الکتروفورز محصول PCR بعد از برش آنزیمی روی ژل آگاروز ۲٪

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-24]

منابع:

حقیقی ، علی و رضائیان، مصطفی (۱۳۷۸) کشت و نگهداری انتامباهیستولیتیکا در محیط کشت سرم منعقده اسب، رینگر و نشاسته برنج(Hsr+s). مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره ۵ شماره ۲ صفحات ٦٤-٦٠.

راستی، سیما. حقیقی، علی. خاتمی، مهرنوش (۱۳۸٤) شناسایی انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار در مراجعین به آزمایشگاه بیمارستان طالقانی تهران٨٤-۱۳۸۳ صفحه ۲۹۵، خلاصه مقالات پنجمین همایش بیماریهای انگلی ایران،تهران٢٦-٢٤ آبان ۱۳۸٤.

هوشیار، حسین. رضائیان، مصطفی. کاظمی، بهرام. حقیقی، علی (۱۳۸۱) تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا وانتامبا دیسپار (ایزوله های تهران)با روش PCR-RFLP نشریه پزشکی یاخته ،سال ٤ شماره ۱۳ صفحه۱۵-۱۱.

Clark C.G. and Diamond L.S. (1991) Ribosomal RNAgens of pathogenic and non- pathogenic Entamoeba histolytica are distinct. *Mol. Bioch. Parasitol.* **49:** 279-302.

Diamond L.S. and Clark C.G. (1993) A redescription of Entamoeba histolytica shaudin, 1903 separating it from Entamoeba dispar. Brumpt, 1925. *J. Euk. Microbiol.* **40**(3): 340-344.

Garcia L.S. (2001) Diagnostic medical parasitology (4th ed) ASM Press. *Washington DC. USA* . 746-748.

Gatti S., Mahdi R., Bruno A., Cevini C. and Scaglia M. (1998) A survey of amoebic infection in the wonji area of central Ethiopia. Annals. *Trop.Med. parasitol.* **92**(2): 73-79.

Guo Z.Z., Zhu H. and An Y.J. (1995) Application of PCR to the epidemiological study of amoebiasis (Abstract). *Chung.Hua.liu.husin-ping - Hsuch-Tsa – chich.* **16**(5): 303-309.

Haque R., Neville L.M., Wood S. and Petri W.AJr. (1994) Detection of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar directly in stool. *Am. J. Trop.Med.Hyg* . **50**(5): 595-96.

Rivera W.L. (1996) Differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar DNA from cyst present in stool speciment by PCR, its field application in the philippines. *Parasitol.Res.* **82:** 585-89.

Robinson G.L. (1968) The laboratory diagnosis of parasitic amoeba. *Trans.R.Soc. Trop.Med. Hyg.* **82:**285-294.

Sargeaunt P.G., Williams J.E. and Grene J.D.(1978) The Differentiation of invasive and noninvasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**(5): 519-21.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, (2th ed). Cold spring Harbor laboratory pres. Cold spring Habor, N.y 1989.

Tachibana H., Kobayashi S., Paz K.C., Aca I.S., Tateno S. and Ihara S. (1992) Analysis of pathogenicity by restriction edndonuclease digestion of amplified genomic DNA of Entamoeba histolytica isolated in pernambuco. Brazil. *Parasitol. Res.* **78:** 433-36.

Tannich E. (1998) Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar : comparsion of molecules considered important for host tissue destruction. *Trans.R.Soc.Trop. Med. Hyg.* **92:** 593-96.

Tanyuksel M. and Petri W.A. (2003) Laboratory diagnosis of amoebiasis. *Clin.Microbiol.Rev* . **16**(4): 713-29.

World Health Organization. (1997) Entamoeba Taxonomy. Bull, WHO. **75**(5): 291-92.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-24]