

تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار و بررسی انگل های روده ای در مناطق روستایی اهواز و حمیدیه

دکتر مصطفی رضاییان: استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه

علوم پزشکی تهران

دکتر حسین هوشیار: استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو 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 و مطالعات اپیدمیولوژی دارای اهمیت میباشد. این دو انگل اگرچه از نظر مرفولوژی کاملاً مشابه اند اما از نظر خصوصیات ژنتیکی، بیوشیمیایی و بیماریزایی کاملاً متفاوتند. به منظور افتراق این دو انگل از یکدیگر و تعیین فراوانی نسبی هر کدام از آنها، این بررسی، روی ساکنان مناطق روستایی اهواز و حمیدیه صورت گرفت.

روش کار: این بررسی به روی نمونه مدفوع ۷۸۲ نفر با دو روش مستقیم و فرمالین اترو صورت گرفت. همچنین ۲۱ نمونه 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٪ از افراد مورد بررسی، حداقل به یکی از انگل های روده ای آلوده بودند. بالاترین میزان آلودگی مربوط به انتامبا کلی

(۵۱/۹٪) و کمترین میزان، مربوط به دی انتامبا فراژیلیس (۰/۷۶٪) و ۶۵/۳٪ نفر (۸/۳٪) به انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار آلوده بودند.

نتایج PCR-RFLP روی ۲۱ نمونه و مقایسه این نمونه ها با نمونه های استاندارد نشان داد که ۱۹ (۹۰/۴۸٪) نمونه انتامبا دیسپار،

نمونه (۴/۷۶٪) انتامبا هیستولیتیکا و ۱ 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:

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 و گونه دیگر، که به نام

انتامبا دیسپار نامیده شد، کاملاً غیر بیماریزا و با انسان حالت

هم سفرگی دارد (Diamond L.S. and Clark C.G. 1993).

این دو گونه از نظر مرفولوژی کاملاً شبیه یکدیگر

هستند و با میکروسکپ نوری افتراق آنها امکانپذیر

نمی باشد، اما تفاوت های ژنتیک، ایمونولوژیک، بیوشیمیایی و

آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار، یکی از

شایع ترین عفونت های تک یاخته ای در جهان

می باشد. تخمین زده شده که حدود ۵۰۰ میلیون نفر

در سرتاسر جهان به این انگل آلوده می باشند و هر سال در

حدود ۱۰۰ هزار نفر به علت ابتلا به آمیبیاز روده ای

و خارج روده ای فوت می کنند (WHO 1997). در طی

دو دهه گذشته ثابت شد که تک یاخته ای که قبلاً به

می باشد و از 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. 1998; Tannich E. 1991). 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 و حمیدیه صورت گرفت. بعد از توضیحات و جلب موافقت افراد، باپخش قوطی های یکبار مصرف پلاستیکی در مجموع ۷۸۲ نمونه مدفوع از افراد سنین مختلف و در دو جنس مذکر و مونث جمع آوری و به آزمایشگاه مرکز آموزش و تحقیقات 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 قرار گرفت.

ب) کشت نمونه ها و استخراج DNA: نمونه های محتوی کیست های انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار در محیط کشت سرم منعقد شده اسب (حقیقی و رضاییان ۱۳۷۸) و محیط رایبسون (Robinson G.L. 1968) کشت و پس از تبدیل به ترفوزوئیت، جهت تکثیر انبوه در محیط رایبسون 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 و تا 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 و ۳ میکرولیتر پروتیناز K افزوده و به مدت ۳ ساعت در بن ماری 60°C قرار داده شد، سپس محلول حاصل

رفتار زیست شناختی آنها سبب می شود تا در حال حاضر با بعضی روش های پیچیده و پرهزینه، نظیر مقایسه الگوی حرکت الکتروفورزی ایزوآنزیم ها (Sargeant P.G. et al. 1978)، استفاده از آنتی بادیهای منوکلنال (Haque R. et al. 1994) و نیز استفاده از روش های ملکولی نظیر PCR، بتوان این دو انگل را از 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 ۴۰-۵۰ 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 ۱۰۰ هزار مورد مرگ و میر در سال به علت آمیبیاز می گردد که بعد از مالاریا، 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 و انتامبا 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 یکدیگر صورت 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 و اطلاع دقیقی در زمینه این دو انگل وجود ندارد، بررسی حاضر در راستای هدف فوق و با روش PCR-RFLP انجام پذیرفت. با توجه به اینکه روش های مبتنی بر شناسایی تفاوت های موجود در سکانس نکلئوتیدها در ژنهای مختلف، روشی بسیار دقیق

انتامبا هیستولیتیکا و سوش 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 و ۱۹۵ نفر (۲۴/۹٪) فاقد هرگونه آلودگی انگلی بودند. میزان آلودگی به تک یاخته ها و کرم های روده ای عبارت بود از : انتامبا کلی ۴۰۶ مورد (۵۱/۹٪)، ژیا ردیا لامبلیا ۱۸۴ مورد (۲۳/۵٪)، یدامبا بوچلی ۱۹۲ مورد (۲۴/۶٪)، انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار ۶۵ مورد (۸/۳٪)، انتامبا هارتمانی ۵۰ مورد (۶/۴٪)، کیلوماس تیکس مسنیلی ۵۳ مورد (۶/۸٪)، اندولیماکس نانا ۲۳ مورد (۲/۹٪)، دی انتامبا فراژیلیس ۶ مورد (۰/۷۶٪)، هیمنسولپیس نانا ۹۱ مورد (۱۱/۶٪)، استرونژیلوئیدس استرکورالیس ۱۵ مورد (۱/۹٪)، اکسیور ۱۲ مورد (۱/۵٪) (جدول شماره ۱).
از ۶۵ مورد انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار که در محیط رایبسون کشت داده شد، ۲۱ مورد (۳۲/۳٪) در محیط کشت استقرار و تکثیر 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 بانداوری حاوی ۵۳۱ جفت نوکلئوتید است که پس از برش آنزیمی برای نمونه استاندارد انتامبا هیستولیتیکا، دو نوار ۳۴۰ و ۱۹۱ جفت نوکلئوتیدی و برای نمونه استاندارد انتامبا دیسپار، ۳ نوار ۶۷، ۱۹۱، ۲۷۳ جفت نوکلئوتیدی ایجاد می کند (تصویر ۱). از ۲۱ نمونه مورد بررسی، پس از تشخیص افتراقی، ۱۹ نمونه (۹۰/۴۸٪) الگوی انتامبا دیسپار، ۱ نمونه (۴/۷۶٪) الگوی انتامبا هیستولیتیکا و ۱ نمونه (۴/۷۶٪) الگوی آلودگی توام با هر دو انگل را نشان داد (تصویر ۱).

۱۰ دقیقه جوشانده شدو DNA با محلول فنل-کلروفرم-ایزومیل الکل استخراج وبا استفاده از الکل اتیلیک مطلق و نمک سدیم استات ۰/۳٪ رسوب داده شد. پس از آن نمک های اضافی با الکل ۷۰٪ شستشو و DNA بدست آمده پس از خشک شدن، در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، حل و در دمای 20°C ذخیره گردید.

ج) انجام PCR و هضم آنزیمی :

جهت انجام PCR از پرایمرهای P1 و P4 طراحی

شده توسط Tachibana و همکاران (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 و در ۳۵ چرخه به شرح زیر انجام گرفت :

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

دنا تورا سیون: ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه،

اتصال: ۵۴/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه،

تکثیر: ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه،

در چرخه نهایی، یک مرحله تکثیر نهایی

(Final extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت

۷ دقیقه انجام می شد.

۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگاروز

۱٪ الکتروفورز شده پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم

برو ماید، بانداوری بدست آمده که با دستگاه UV

Transilluminator در طول موج ۲۵۴ نانومتر در کنار

مارکر و نمونه استاندارد مشاهده گردید. برش آنزیمی به

مدت ۲ ساعت با استفاده از آنزیم *HinfI* در حرارت ۳۷

درجه سانتی گراد انجام شد و قطعات حاصل از برش

آنزیمی روی ژل آگاروز ۲٪، پس از رنگ آمیزی با

اتیدیوم برو ماید در کنار مارکر و بانمونه های استاندارد

مقایسه گردید. در این بررسی از سوش HM1:IMSS

بحث :

تکنیک 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 ایمونولوژیک برای مجزا بودن این دو گونه بقدری محکم و مستدل است که در سال ۱۹۹۳ تعریف مجددی از انتامباهیستولیتیکا توسط دیاموند و گراهام کلارک 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 در کشورهایی 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 عفونت‌های 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 آمیب‌ها 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 ۴ 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٪ موارد را انتامبا دیسپار و ۱۸٪ را انتامبا هیستولیتیکا و ۳٪ را آلودگی توأم تشکیل داده است (Guo Z.Z. et al. 1995) و یا 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٪) الگوی انتامبا دیسپار و ۲ مورد (۶٪) 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 روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند هر ۸ نمونه الگوی انتامبا دیسپار را نشان دادند (هوشیار و همکاران ۱۳۸۱). همچنین، هر ۴ مورد انگل جدا شده از مراجعان به بیمارستان طالقانی تهران که با روش PCR مورد بررسی قرار گرفته شد، انتامبا دیسپار بود (راستی و همکاران ۱۳۸۴). لازم به یاد آوری است که با توجه به خصوصیات بیولوژی، کشت آمیب‌ها همواره با موفقیت کامل همراه نمی‌باشد و در بهترین شرایط حدود ۶۰٪ میباشد (حقیقی و همکاران ۱۳۷۸)، در این بررسی نیز ۲۱ مورد (۳۲٪) از نمونه کشت موفقیت آمیز داشتند.

نتیجه گیری :

با توجه به مطالعات فوق و بررسی حاضر بنظر می‌رسد در مناطق مرکزی ایران و فور انتامبا هیستولیتیکا نسبت به مناطق جنوبی بسیار کمتر باشد. اما اظهار نظر قطعی در این زمینه، بررسی و مطالعات بیشتری را می‌طلبد.

تشکر و قدردانی :

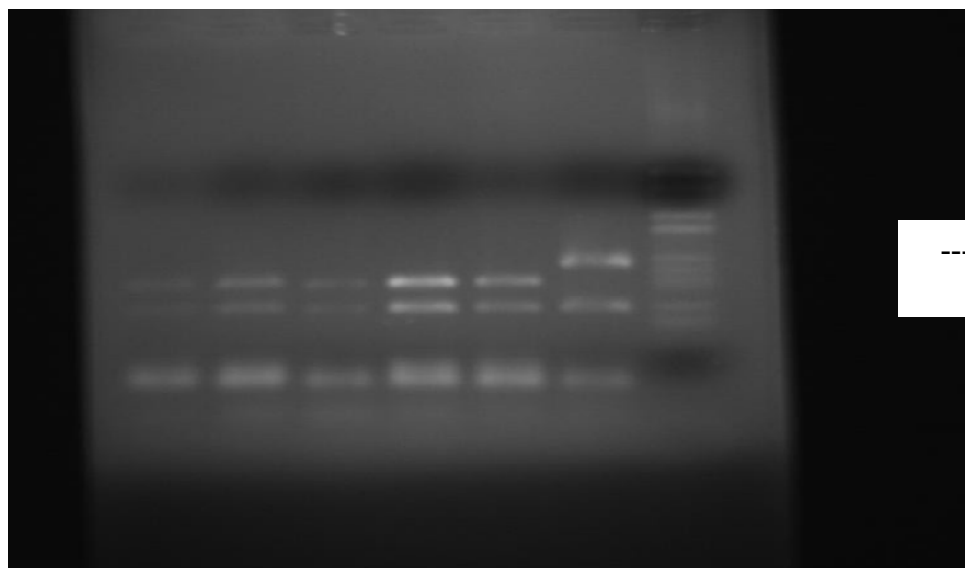
همچنین نویسندگان مقاله از همکاری کارمندان محترم مرکز آموزش و تحقیقات اهواز و نیز از زحمات خانم فرنیبا و خانم بابایی و آقای شهرام سلیمانی شاغل در آزمایشگاه تک یاخته های روده ای تشکر و قدردانی می کنند.

این پژوهش با حمایت مالی قطب علمی انیستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران (طرح تحقیقاتی شماره ۲۴۱/۸۲/۵۹) انجام گردیده است .

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

نوع آلودگی	تعداد	درصد
انتامبا کلی	۴۰۶	۵۱/۹
انتامبا هیستولیتیکا/دیسپار	۶۵	۸/۳
ژیاردیا لامبلیا	۱۸۴	۲۳/۵
یدامبا بوچلی	۱۹۲	۲۴/۶
انتامبا هارتمانی	۵۰	۶/۴
اندولیماکس نانا	۲۳	۲/۹
کیلوماستیکس مسنیلی	۵۳	۶/۸
دی انتامبا فراژیلیس	۶	۰/۷۶
هیمنولیس نانا	۹۱	۱۱/۶
استرنژیلوئیدس استر کورالیس	۱۵	۱/۹
اکسیور	۱۲	۱/۵
فاقد آلودگی	۱۹۵	۲۴/۹
کل موارد آلودگی	۵۸۷	۷۵/۱

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷



---۳۴۰

۲۷۳--
۱۹۱--

۱: مارکر ۲: استاندارد انتامبا هیستولیتیکا ۳: استاندارد انتامبا دیسپار ۴-۷: نمونه ها

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

منابع:

- 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 specimen 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.
- Sargeant 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 endonuclease 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.
- حقیقی ، علی و رضائیان، مصطفی (۱۳۷۸) کشت و نگهداری انتامبا هیستولیتیکا در محیط کشت سرم منعقد اسب، رینگر و نشاسته برنج (Hsr+s). مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره ۵ شماره ۲ صفحات ۶۴-۶۰.
- راستی، سیما. حقیقی، علی. خاتمی، مهنوش (۱۳۸۴) شناسایی انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار در مراجعین به آزمایشگاه بیمارستان طالقانی تهران ۸۴-۱۳۸۳ صفحه ۲۹۵، خلاصه مقالات پنجمین همایش بیماریهای انگلی ایران، تهران ۲۶-۲۴ آبان ۱۳۸۴.
- هوشیار، حسین. رضائیان، مصطفی. کاظمی، بهرام. حقیقی، علی (۱۳۸۱) تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار (ایزوله های تهران) با روش PCR-RFLP نشریه پزشکی یاخته، سال ۴ شماره ۱۳ صفحه ۱۵-۱۱.
- Clark C.G. and Diamond L.S. (1991) Ribosomal RNA genes 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.A Jr. (1994) Detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba*