دو فصلنامه طب جنوب
دانشگاه علوم پزشكي و خدمات بهداشتي درماني بوشهر
سال هفتم، شماره ۲، صفحه ۱۰۷- ۱۱۲ (اسفند۱۳۸۳)

بررسي و تفكيك زايمودم هاي انتامبا هيستوليتيكا و انتامبا ديسپار در جنوب ايران

دكتر نعمت اله صاحباني*[۱] ، دكتر لامع اخلاقي[۲] ، دكتر هرمزد اورمزدي[۳] ، دكتر غلامرضا حاتم[۴] ، دكتر محمد حسين معتضديان[۵]

[۱]استاديار انگل شناسي ، دانشكده پزشكي ، دانشگاه علوم پزشكي بوشهر
[۲]استاديار انگل شناسي ، دانشكده پزشكي ، دانشگاه علوم پزشكي ايران
[۳]استاد انگل شناسي ، دانشكده پزشكي ، دانشگاه علوم پزشكي ايران
[۴]استاديار انگل شناسي ، دانشكده پزشكي ، دانشگاه علوم پزشكي شيراز
[۵] دانشيار انگل شناسي ، دانشكده پزشكي ، دانشگاه علوم پزشكي شيراز

چكيده:

آزمايش ميكروسكوپي مدفوع نمي تواند انتامبا هيستوليتيكا را از انتامبا ديسپار تفريق دهد.جهت تشخيص و تفريق اين دو گونه از يكديگر،ايزوآنزيم الكتروفورزيس يك روش استاندارد طلايي مي باشد. براي شناسائي زايمودم هاي مختلف انتامبا هيستوليتيكا / ديسپار در جنوب كشور ، ۲۳ نمونه مثبت شناسائي شدند و با استفاده از الكتروفورز، ايزوآنزيم هاي چهار آنزيم هگزوكيناز،ماليك انزيم،فسفوگلوكوموتاز و گلوكز فسفات ايزومراز آنها مورد بررسي قرار گرفت.از اين تعداد ۶ مورد انتامبا هيستوليتيكا و بقيه ۱۷ مورد انتامبا ديسپار تشخيص داده شدند.زايمودم نمونه هاي انتامبا هيستوليتيكا II و XIV و زايمودم نمونه هاي انتامبا ديسپار XVII، XVI،I و XVIII تشخيص داده شدند. در نتيجه بر اساس روش شناسايي آيزوزوآنزيم الكتروفورزيس ، بسياري از نمونه هايي كه بعنوان انتامبا هيستوليتيكا گزارش شده اند در حقيقت آنتامبا ديسپار مي باشند .

واژگان كليدي: انتامبا هيستوليتيكا، انتامبا ديسپار، آيزوانزيم، زايمودم

---

* بوشهر، خيابان معلم، دانشگاه علوم پزشكي، مديريت پژوهشي تلفن ۰۷۷۱-۲۵۲۸۵۸۷ ص.پ: ۳۶۳۱
E.mail : hatam25@hotmail.com

مقدمه

آميبيازيس،يك عفونت تـك ياختـه اي روده اي بـا گسترش جهاني است كه به وسيله ي انتامبـا هيسـتوليتيكا ايجاد مي شود.همه ساله حدود ۵۰۰ ميليون نفر بـه انتامبـا هيستوليتيكا/انتامبا ديسپار آلوده مي شوند كه قريـب ۱۰۰-۴۰ هزار نفر از آنان در اثر آميبيازيس فوت مي كنند و بعد از مالاريـــا و شيســـتوزوميازيس(Schistosomiasis) بيشترين مورد مرگ و مير در بين بيمـاري هـاي انگلـي را به خود اختصاص داده است(۱و۲).

آزمايش ميكروسكپي معمولي مدفوع نمي تواند انتامبا هيستوليتيكا را از انتامبا ديسپار تفريق كند،مگر در مواردي كه فرم تروفوزوئيت هماتوفـاژ انگـل ديـده شـود و يـا از تست سرولوژي و آزمايش هاي تكميلي ديگر نيز اسـتفاده گردد(۳).

براي تشخيص و تفريق انتامبا هيسـتوليتيكا از انتامبـا ديسپار و نيز براي تعيين سـويه و زايمـودم هـاي ايـن دو انگــل در جامعــه،آيزوانزيم الكتروفــورزيس يــك ابــزار بيوشيميائي مناسب مي باشد(۴).

سرژانت(Sargeaunt) در سـال ۱۹۸۵بـا اسـتفاده از آيزوانزيم الكتروفورز آنزيم هاي گلوكز فسفات ايزومراز(GPI E.C. 5 3 1 9) ،هگزوكيناز HK) (E.C 2 7 1 1،ماليك آنزيم (ME E.C 1 1 1 40) و فسفوگلوكوموتاز(PGM E.C 2 7 5 1) و آزمايش حـدود ۱۰ هـزار نمونـه از سراسـر دنيـا، بـيش از بيسـت زايمودم مختلف را براي اين دو انگل تعريف كرده اسـت كه ۸ زايمـودم آن مربـوط بـه انتامبـا هيسـتوليتيكا و بقيـه مربوط به انتامبا ديسپار مـي باشـد(۵).الگـوي مربـوط بـه انتامبا هيستوليتيكا مبتني بر وجود بانـد**β** و عـدم بانـد **α** در آنزيم فسفو گلوكوموتاز و وجود باند با مهاجرت نسبي سريع در آنزيم هگزوكيناز مي باشد(۶).

مطالعه ي حاضر كه براي نخستين بار در ايران انجـام گرفته است جهت بررسي و مشخص كردن زايمودم هاي انتامبـا هيسـتوليتيكا / ديسـپار در جنـوب ايـران طراحـي گرديده است.

مواد و روش ها

نمونه ي مدفوع از افـرادي كـه بـه آزمايشـگاه هـا و بيمارستان هاي مختلف شهرستان شيراز ونيز يك مركز در شهرستان بوشهر و آبادان مراجعه مـي كردنـد آزمـايش و مـواردي كـه بـه آميـب آلـوده بودنـد در محـيط كشـت رابينسون(Robinson) (۷) كشـت داده مـي شـدند. بـر اساس دستورالعمل كشت مذكور و زماني كه تعداد آميب بـه حـدود $۱۰^{۴} \times ۵$ آميـب در هـر ميلـي ليتـر رسـوب مي رسيد، انگل ها جمع آوري و بعد از چند بار شستشـو با نرمال سالين، ابتدا هم حجم آن ماده ي نگـه دارنـده ي آنـزيم كـه شـامل دي تيـو ترايتـول(Dithiothritol) ، EDTA و آمينو كوپروئيك اسيد Amino coproic) (acid مي باشد اضافه مي شد. در مرحله ي بعد و بعد از ۲ بـار ذوب و انجمـاد (Freezing and thawing) بلافاصله نمونه ها به مدت ۱۰ دقيقـه در ۱۰ هـزار دور و در ۴ درجه سانتي گراد سانتريفيوژ كرده و مايع روئـي آن كه محتوي آنزيم هاي آميب مي باشد براي انجـام مراحـل الكتروفورز در ۲۰- درجه و يا نيتروژن مايع نگه داري مي شد.

براي انجام الكتروفورز از سيستم PAGE يا پلي اكريلامايدژل الكتروفورزيس غير پيوسته يا (Discontinious Poly Acrylamaide Gel Electrophoresis) و با استفاده از دستگاه الكتروفورز Bio rad (Cat.No.#165-3301) استفاده گرديد.

بعد از تهيه و ساخت ژل هاي Separating و Stucking و ايجاد چاهك در ژل(Stucking) ، در هر كدام از چاهك ها بسته به نوع آنزيم (هگزوكيناز، فسفوگلوكوموتاز ،گلوكزفسفات آيزومراز و ماليك انزيم) و با استفاده از سرنگ هاميلتون مقدار۳۰-۸ ميكروليتر از نمونه را به همراه يك ميكروليتر رنگ نشانه ي بروموفنل بلو+گليسرول ريخته و سيستم به جريان برق متصل مي شد.بعد از ۴۵ دقيقه جريان برق قطع و ژل خارج شده و روي ژل سوبستراي آنزيم مربوطه ، كوآنزيم و رنگ هاي متيل تيازوليل تترازوليوم(MTT) و فنازين متوسولفات

(PMS) و آگارز اضافه و به مدت ۳۰-۵ دقيقه در ۳۷ درجه سانتي گراد اينکوبه شده تا باند هاي آن ظاهر شوند. سپس مشخصات باند هاي تشکيل شده يادداشت و از آن ها عکس تهيه مي شد.

جهت مقايسه نياز است که نمونـه هـاي اسـتاندارد انتامبـا هيستوليتيکا و انتامبا ديسپار و نيز آنزيم باکتري هاي همراه آميب نيز در چاهک هاي جداگانه اي لود شوند.

نتايج

در طول دوره تحقيق ۲۳ مورد مثبت انتامبا هيستوليتيکا /ديسپار در محيط های کشت رشد کردند که بعد از کشت انبوه و رسوب گيری مورد آزمايش آنزيم الکتروفورزيس قرار گرفتند.

نتايج حاصل از ايزوانزيم نمونه هاي مجهول در مقايسه با نمونه هاي استاندارد

الف- گلوکز فسفات ايزومراز:

در الکتروفورز اين آنزيم ، نمونه هاي شماره ۲،۱،۲۲،۱۷،۱۵،۱۳،۹،۸،۷،۴ ايجاد يك باند منفرد در منطقه آلفا نمودند. نمونه هاي شماره ۱۴،۱۲ و۲۱ داراي دو باند در منطقه آلفا و دلتا و نمونه شماره ۱۱ ايجاد يك باند در منطقه بتا و نمونه هاي شماره ۱۸،۱۶،۶،۵،۳،۱۹ و۲۳ داراي دو باند در منطقه آلفا و گاما و نمونه شماره ۱۰ ايجاد دو باند در منطقه آلفا و دلتا نمودند (تصوير ۱).

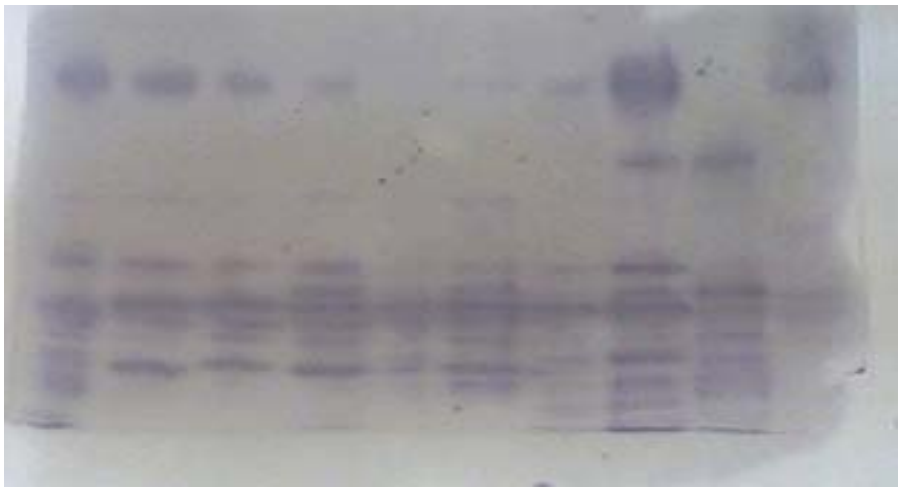
ب- فسفوگلوکوموتاز:

در الکتروفورز اين آنزيم نمونه هاي شماره ۱،۲۰،۱۱،۲ ايجاد يك باند منفرد در منطقه بتا نمودند. اين در حالي است که نمونه هاي شماره ۹،۸،۵،۳، ۲۱،۱۴،۱۳،۱۲،۱۰ و۲۳ در منطقه آلفا ايجاد باند نمودند (تصوير ۲).

ج- ماليك انزيم:

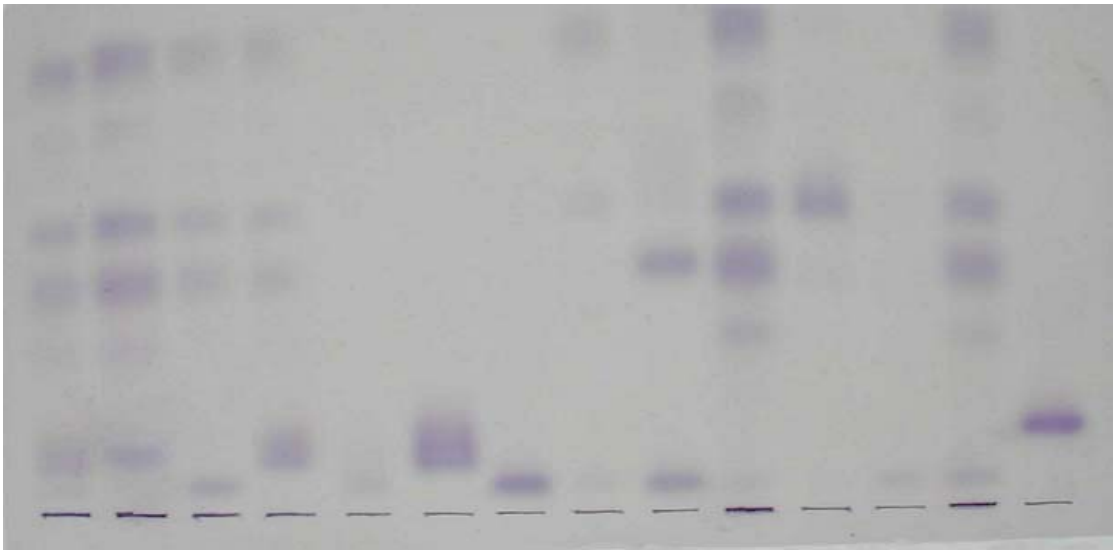
تمام ايزوله هاي جدا شده از جنوب کشور ايجاد يك باند منفرد در يك محدوده خاص نمودند و از اين نظر تفاوتي بين نمونه هاي مختلف مشاهده نگرديد.

23 19 18 17 Bac. 16 13 12 11 10



تصوير شماره ۱ : مقايسه ي الکتروفورز آيزوزيم هاي گلوکز فسفات ايزومراز (GPI) نمونه هاي انتامبا *هيستوليتيکا* و انتامبا *ديسپار* روي ژل پلي اکريلامايد.

Bac. = Bacterial sample.



تصوير شماره ۲: مقايسه ي الكتروفورز آيزوزيم هاي فسفوگلوكو موتاز(PGM)
نمونه هاي انتامبا *هيستوليتيكا* و انتامبا *ديسپار* روي ژل نشاسته

S.h = Standard of Entamoeba *histolytica*
S.d = Standard of Entamoeba *dispar*
E.ch.= Entamoeba *chatton*

جدول شماره ۱: زايمودم نمونه هاي جدا شده از بيماران آلوده به انتامبا هيستوليتيكا و انتامبا ديسپار در جنوب ايران

ME	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
HK			– –	– –		– –	– –	– –			– –
PGM	–	–						–	–		–
GPI	–	– –	–	– –	–	– –	– –	–	– –	–	– –
Z	I	XVI	I	*	*	XVII	XVII	II	XVII	II	XVII
N	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**

ME	–			–	–	–	–			–	–	
HK	– –		– –	– –	– –	– –	– –	– –	– –	– –	– –	– –
PGM	–	–	–		–			–	–	–	–	–
GPI	–	–	– –	–	– –	– –	–	–	–	– –	–	– –
Z	II	II	XVII	II	XVII	XVII	I	I	I	XVIII	XIV	XVI
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

=* به دليل مشخص نشدن باندها در آنزيم هاي PGM وHK شماره ي زايمودم اين دو سويه شناسايي نگرديد

د – هگزوكيناز

در اين انزيم نمونه ها ايجاد دو باند مجزا مي نمايند كه يا با حركت نسبي سريع و يا با حركت نسبي كند مشخص مي شوند. بر اين اساس نمونه هاي شماره۱،۴،۱۱ و۲۰ با مهاجرت نسبي تندتر و نمونه هاي شماره ۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۲،۱۵،۱۶،۱۸،۱۹ و۲۳ با مهاجـــرت نـــسبي كندتر ايجاد باند نمودند.

جدول شماره ی ۱ زایمودم های تشخیص داده شده در نمونه های مختلف را نشان می دهد. چنانکه مشاهده می شود از ۶ موردی که انتامبا هیستولیتیکا تشخیص داده شده بود، یک مورد از استان بوشهر جمع آوری شده بود

که زایمودم شماره ی (XIV) و بقیه زایمودم شماره ی (II) بودند.
زایمودم های انتامبا دیسپار شامل زایمودم های شماره ی (I)، (XVI)، (XVII)،(XVIII) بودند.

بحث

تکنیک آیزوآنزیم الکتروفورزیس برای تفکیك زایمودم هاي انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار مستلزم وجود مقدار مناسب آنزیم است و بدست آوردن این مقدار آنزیم جز با کشت آمیب میسر نمی باشد.انجام کشت هم در محیط های اگزنیک و هم در محیط های گزنیک امکان پذیر است ولی چون کشت اگزنیک مستلزم صرف وقت بسیار طولانی است بنابراین اکثر محققین از کشت های غیر اگزنیک مخصوصا محیط کشت رابینسون استفاده می کنند(۴ و ۸).
در این تحقیق در ابتدا هم از محیط کشت سرم منعقده (Hrs-S) و هم از محیط کشت رابینسون استفاده شد. آماده سازي محیط کشت سرم منعقده بسیار ساده بوده و از مواد محدودي در تهیه ي آن استفاده مي شود و براي نگهداري و نقل و انتقال آمیب بسیار مناسب مي باشد(۹) اما به دلیل بازدهی بهتر محیط کشت رابینسون و بدست آمدن تعداد مناسب آمیب در این محیط به تدریج محیط سرم منعقده کنار گذاشته شد.
در انجام الکتروفورز حتما نیاز به نمونه ی استاندارد انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار می باشد. که در این تحقیق از نمونه های استاندارد هیستولیتیکا شامل: (HM-1 (Z=19),(Z=14) و نمونه انتامبا دیسپار (AS-16) استفاده شد که صمیمانه از بخش تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران و دانشگاه Keio در کشور ژاپن در اختیار قرار گرفت.
بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق شایع ترین زایمودم انتامبا هیستولیتیکا درجنوب ایران ، زایمودم شماره (II) (۸۳%)مي باشد.این زایمودم شایع ترین زایمودم گزارش شده از نقاط مختلف دنیا خصوصا در آفریقا مي باشد(۶ و ۱۰). زایمودم شماره ي XIV یکي دیگر از زایمودم هاي تشخیص داده شده در این تحقیق است که از استان بوشهر جدا گردید.این زایمودم در کشور هند جزو شایع ترین زایمودم هاي انتامبا هیستولیتیکا مي باشد.اگر چه در سایر کشورها نیز گزارش گردیده است(۴).
نمونه هاي شماره ۱،۲،۴،۲۰ و ۲۲ زایمودم شماره دو تشخیص داده شدند .این نمونه ها با ایجاد یك باند منفرد در آنزیم GPI در منطقه آلفا روی ژل پلی اکریلامايد با RM=۰/۲۳ و یک باند منفرد در آنزیم مالیک انزیم و با RM=۰/۶۵ و دو باند با مهاجرت نسبی سریع در ژل هگزوکیناز با ۰/۶۴ و ۰/۹۴ = RM وایجاد یک باند در منطقه ی بتا در آنزیم PGM مشخص شدند.
نمونه ی شماره ی ۱۱ زایمودم شماره ۱۴ تشخیص داده شد که با ایجاد یک باند در منطقه ی بتا در آنزیم GPI وایجاد باند هایي با مهاجرت نسبی سریع در آنزیم HK و یک باند در منطقه ی بتا در آنزیم PGM متمایز گردید.
همان گونه که در شکل های ۱،۲،۳،۴ مشاهده می شود،نمونه های مربوط به انتامبا دیسپار در آنزیم HK با ایجاد دو باند با مهاجرت نسبي کندتر از نمونه های هیستولیتیکا و در آنزیم PGM با ایجاد باند در منطقه ی آلفا مشخص می شوند.
شماره زایمودم آن ها بر حسب ایجاد باند در مناطق مختلف آنزیم GPI مشخص می شود.بر این اساس زایمودم های شماره ی (I) (۲۹/۵%) ،زایمودم شماره ی(XVI)(۱۷%)،زایمودم شماره ی (XVII) (۴۷%) و زایمودم شماره ی (XVIII) (۶%) شناسایي گردیدند.
تمام نمونه هایی که انتامبا هیستولیتیکا تشخیص داده شدند در بیماران با علایم بیماری همراه بودند.این در حالی است که در تعدادی از افرادی که به انتامبا دیسپار آلوده بودند هم ناراحتی های گوارشی دیده شد.لازم به ذکر است که بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی اگر در فردی که دارای علایم گوارشی است آمیب غیر هماتوفاژ مشاهده شود،نباید آن را صد در صد انتامبا

هیستولیتیکا فرض کرد،مگر آنکه تست های تکمیلی دیگر،هیستولیتیکا بودن آن را تایید نماید.در این صورت می بایست سایر عوامل ایجاد کننده اسهال مد نظر قرار گیرد(۳).از طرف دیگر به دلیل آنکه کارشناسان آزمایشگاه نمونه هایي در اختیار این تحقیق قرار مي دادند که عمدتا بصورت اسهالي و دیسانتري بوده و انتامبا هیستولیتیکا تشخیص داده شده بودند. با آزمایشات تکمیلي که روي این نمونه ها به عمل آمد مشخص گردید که بسیاري از این نمونه ها حاوي ماکروفاژ، بلاستوسیستیس هومینیس و یا انتامبا کولي بودند و تعدادي هم به انتامبا دیسپار آلوده بودند. این افراد احتمالا به سایر عوامل ایجاد کننده اسهال (عوامل ویروسي و باکتریایي) آلوده بودند.لذا این بیماران در حالي که در اثر عوامل ویروسي و یا باکتریایي دچار علایم بیماري بودند.در نمونه مرضي آن ها آمیب هم دیده مي شد.

از این مشاهدات دو نتیجه بدست مي آید:

۱- علایم ایجاد شده مربوط به انتامبا دیسپار است که این ادعا خلاف نتایج بدست آمده سال هاي اخیر مبني بر غیر بیماري زا بودن انتامبا دیسپار است(۳).

۲- افرادي که علائم بیماري در آن ها بوجود آمده در حالي که به انتامبا دیسپار غیر بیماري زا آلوده بودند حد اقل به یك ارگانیسم ایجاد کننده ي بیماري دیگرهم ، مبتلا بودند و علائم ایجاد شده مربوط به عامل دوم مي باشد.این نتیجه گیري با دست آوردهاي جدید سازگاري بیشتري دارد.

References :

1. Gonzalez-Ruiz A, Haque R, Rhman T, et al.. Diagnosis of amebic dysentery by detection of Entamoeba histolytica fecal antigen by an invasive strain specific monoclonal antibody –based enzyme linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1994; 32: 964-970.

2. Bhattacharya A, Satish S, Baghi A, et al.The genome of Entamoeba histolytica. Inter J Parasitol 2000; 30:401-410.

3. World Health Organization. Amoebiasis.W.H.O Weakly Epidemiol Rec 1997; 72:97-100.

4. Bavej UK, Francis S, Kaura M, et al. The Zymodemes of Entamoeba histolytica in New Delhi, India. J Diarrhoeal Dis 1990; 8:27-30.

5. Sargeaunt PG. Zymodems expressing possible genetic exchange in Entamoeba histolytica. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985; 79:86-9.

6. Sargeaunt PG,Williams JE, Grene JD. The differentiation of invasive and noninvasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis.Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1978 ;72:437.

7. Robinson GL.The Laboratory diagnosis of human parasitic amoeba. Trans R Soc Trop Med Hyg 1968; 62 : 285- 94.

8. Haque R, Ali IKM, Akther S, et al. Comparison of PCR Isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of Entamoeba histolytica infection. J Clin Microbiol 1998 ;36:449-52.

۹- حقیقي ع، رضائیان م ، کشت و نگه داري انتامبا هیستولیتیکا در محیط کشت سرم اسب،رینگر و نشاسته برنج (HSr+S) ، مجله دانشگاه علوم پزشکي کرمان، دوره پنجم (شماره ۲):۱۳۷۷، ۶۴-۶۰.

10. Gathiram V, Jackson TFHG. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of Entamoeba histolytica. S Afr Med J 1987; 72:669-672.