REVIEW ARTICLE

Current and Novel Laboratory Diagnostic Methods for Amebiasis

Mahdi Fakhar[1],
Mahboobe Taghavi[2],
Hamed Kalani[3],
Mahboobe Montazeri[2],
Hajar Ziaei[4]

[1] Associate Professor, Department of Parasitology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] MSc Student in Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] PhD Student in Parasitology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Parasitology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 4, 2014 ; Accepted March 14, 2014)

Abstract

The genus *Entamoeba* contains many species, six of which (*Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, Entamoeba moshkovskii, Entamoeba polecki, Entamoeba coli, and Entamoeba hartmanni*) reside in the human intestinal lumen. *Entamoeba histolytica* is the causative agent of amebiasis in humans with a worldwide distribution. Correct detection of *E.histolytica* is frequently a major concern in diagnostic medical laboratories that also influences treatment procedure. Data was collected through available scientific databases such as Google scholar, Pub Med, IranMedex, ScienceDirect, SID and parasitology text books. Among diagnostic methods, microscopic and serological methods despite their wide application are not efficient. New approaches to the identification of *E. histolytica* are based on detection of *E. histolytica*-specific antigen and DNA in stool and other clinical samples. Several molecular diagnostic tests have been developed for the detection and differentiation of *E. histolytica, E. dispar*, and *E. moshkovskii* (which share identical morphology) in clinical samples. Application of specific diagnostic methods was recommended to avoid misdiagnosis in individuals infected with other species of *Entamoeba* such as *E. dispar* and *E. moshkovskii* using microscopic examination. Therefore, the integration of new and current accurate diagnostic methods will lead to a better understanding of the amebiasis.

The aim of this non-systematic review was to investigate different diagnostic and differential detection methods for E. *histolytica, E. dispar*, and *E. moshkovskii*.

Keywords: Amebiasis, diagnosis, *Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar Entamoeba moshkovskii*

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(122): 440-455 (Persian).

مجـلـــه دانـشـگاه عـلـــوم پـزشـکـــی مـــازنـــدران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۲۲ اسفند سال ۱۳۹۳ (۴۴۰-۴۵۵)

روش های های رایج و نوین تشخیص آزمایشگاهی بیماری آمیبیاز

مهدی فخار[۱]
محبوبه تقوی[۲]
حامد کلانی[۳]
محبوبه منتظری[۲]
هاجر ضیایی[۴]

چکیده

جنس انتاموبا دارای گونه‌های متعددی است که ۶ گونه ا.هیستولیتیکا، ا.دیسپار، ا.موشکوفسکی، ا.کلی، ا.هارتمانی و ا.پولکی در لومن روده انسان زندگی می‌کنند. از میان گونه های نامبرده تنها ا.هیستولیتیکا مسئول ایجاد بیماری آمیبیازیس در انسان بوده و گسترش جهانی دارد. شناسایی دقیق آمیب هیستولیتیکا، یکی از معضلات آزمایشگاه های تشخیص طبی و دغدغه پزشکان برای درمان می باشد.

جامعه مورد مطالعه از پایگاه های اطلاعاتی قابل دسترس نظیر SienceDirect Google Scholar, PubMed، IranMedex ,SID, Magiran و کتاب های مرجع انگل شناسی گردآوری شد. از میان روش های تشخیصی مختلف، روش‌های میکروسکوپی و سرولوژی علی‌رغم کاربرد وسیع، کارآیی لازم را ندارند. روش‌های جدید تشخیص آزمایشگاهی عفونت ا.هیستولیتیکا بر پایه شناسایی آنتی ژن های اختصاصی و یا DNA انگل در نمونه مدفوع و یا سایر نمونه‌های بالینی استوار است. روش های مولکولی متنوعی برای تشخیص افتراقی ا.هیستولیتیکا، ا.دیسپار و ا.موشکوفسکی که از لحاظ مورفولوژی شبیه هم هستند، طراحی شده‌اند که این مسئله در مطالعات اپیدمیولوژی آمیبیازیس به ویژه در مناطق آندمیک تحول بزرگی به وجود آورده است. در مجموع، برای پرهیز از درمان افرادی که در نمونه مدفوع آن‌ها با روش میکروسکوپی به صورت اشتباه، ا.هیستولیتیکا به جای ا.دیسپار و یا ا.موشکوفسکی گزارش می شود، به کارگیری روش های دقیق تشخیصی توصیه شده است. از این رو با به کارگیری و ادغام روش‌های دقیق تشخیصی نوین ورایج می‌توان شناخت بهتری از بیماری آمیبیازیس داشت.

لذا هدف از این مطالعه مروری غیر نظام مند، بررسی روش‌های مختلف تشخیص آزمایشگاهی آمیبیاز و روش‌های تشخیص افتراقی گونه‌های ا.هیستولیتیکا، ا.دیسپار و ا.موشکوفسکی از یکدیگر بود.

واژه های کلیدی: آمیبیازیس، تشخیص، انتاموبا هیستولیتیکا، انتاموبا دیسپار، انتاموبا موشکوفسکی

مقدمه

۶ گونه آمیب جنس انتاموبا (ا.) شامل آمیب‌های هم سفره ا.کلی (*E.coli*)، ا.هارتمانی (*E.hartmanni*)، ا.دیسپار (*E.dispar*)، ا.موشکوفسکی (*E.moshkovskii*) و آمیب بیماری زای ا.هیستولیتیکا (*E.histolytica*)

مولف مسئول: مهدی فخار– ساری، کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی Email:Mahdi53@yahoo.com
۱. دانشیار، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی،کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی دکتری انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴. استادیار، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۲/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۳/۲/۲۲ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۱۲/۲۳

می‌توانند در انسان ساکن باشند. گونه ششم ا.پولکی (*E.polecki*) آمیب روده خوک‌ها و میمون‌ها بوده که گاهی در انسان نیز دیده شده و ممکن است سبب ایجاد اسهال شود. تمام گونه‌های نامبرده تاکنون از انسان گزارش شده‌اند و از این آن‌ها تنها ا.هیستولیتیکا مسئول ایجاد بیماری آمیبیازیس در انسان می‌باشد وگسترش جهانی دارد. گونه‌های دیگر غیربیماری زا بوده و خطری برای انسان ندارند، اگر چه ممکن است سبب اسهال مختصری در انسان شوند(۱). اما نتایج برخی مطالعات حاکی از جداسازی ا.دیسپار و ا.موشکوفسکی از بیماران با علائم گوارشی بوده است ولی تاکنون شواهد قطعی دال بر بیماری‌زا بودن این دوگونه برای انسان وجود ندارد(۴-۲).

در سراسر دنیا حدود ۵۰ میلیون فرد مبتلا به آمیبیازیس خارج روده‌ای وجود دارد که سالانه موجب مرگ ۱۰۰ هزار نفر از آن‌ها می‌شود(۵). اگرچه این انگل گسترش جهانی دارد، اما شیوع بیش از ۱۰ درصد معمولاً از کشورهای در حال توسعه گزارش شده است. با وجود این که تلاش‌های زیادی برای پیشگیری و کنترل این بیماری انجام شده است، اما نتایج چشمگیری به دست نیامده است. با توجه به این که انسان تنها میزبان ا.هیستولیتیکا می‌باشد، یک برنامه‌ریزی منظم و دقیق در ریشه‌کنی آمیبیازیس می‌تواند موثر واقع شود، چرا که علی‌رغم درمان موثر آمیبیازیس، هنوز میزان شیوع و مرگ و میر ناشی از این بیماری پا برجاست(۶،۷). روش‌های مولکولی متنوعی برای تشخیص افتراقی ا.هیستولیتیکا، ا.دیسپار و ا.موشکوفسکی که از لحاظ مورفولوژی شبیه هم هستند، که در این مقاله به آن‌ها اشاره خواهد شد(۸،۹).

شناسایی دقیق آمیب هیستولیتیکا، یکی از معضلات آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و دغدغه پزشکان برای درمان است. لذا هدف از مطالعه حاضر، مروری بر روش‌های مختلف تشخیص آزمایشگاهی آمیبیاز و روش‌های تشخیص افتراقی گونه‌های ا.هیستولیتیکا، ا.دیسپار و ا.موشکوفسکی از یکدیگر بود.

مواد و روش ها

مطالعه حاظر از نوع مروری غیر نظام مند است. مقالات مورد استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی قابل دسترس نظیر Scientific Information Database (SID)، Google Scholar، PubMed، SienceDirect، IranMedex، Magiran، Irandoc و کتاب‌های مرجع انگل شناسی موجود گردآوری شدند.

اهمیت تشخیص

تاکنون بررسی‌های اپیدمیولوژی ا.هیستولیتیکا، ا.دیسپار و ا.موشکوفسکی بر اساس خصوصات مورفولوژی آن‌ها صورت گرفته است و از آن‌جایی‌که این ۳ گونه از لحاظ مورفولوژی شبیه هم هستند، اطلاعات منتشر شده درباره اپیدمیولوژی این ۳ گونه صحیح نمی‌باشد. اما به نظر می‌رسد شیوع ا.دیسپار ۱۰ برابر بیش‌تر از ا.هیستولیتیکا باشد و در مورد شیوع ا.موشکوفسکی اطلاعات کمی در دسترس می‌باشد. به دلیل این که این ۳ گونه انتاموبا را نمی‌توان از لحاظ مورفولوژی تفکیک کرد، سازمان بهداشت جهانی (WHO) به کارگیری روشی اختصاصی برای تشخیص ا.هیستولیتیکا (عامل آمیبیازیس) را پیشنهاد کرده است. بررسی‌های اپیدمیولوژی آمیبیازیس باید شامل روش‌هایی باشند که بتوان ا.هیستولیتیکا و ا.دیسپار را منحصراً در یک زمان و به طور کاملاً دقیق از هم تفریق داد(۱۰).

علائم بالینی

همان‌طور که گفته شد آمیبیازیس به ۳ شکل بدون علائم، همراه با دیسانتری و یا به صورت آمیبیازیس خارج روده‌ای دیده می‌شود که در زیر به آن‌ها اشاره شده است:

۱- آمیبیازیس بدون علائم

این گونه افراد که اغلب ۹۰ درصد موارد آمیبیازیس را تشکیل می‌دهند، یا بدون علائم و یا دارای علائم خفیف هستند. هر چند آمار فوق مبتنی بر مشاهدات

میکروسکپی بوده و اعتبار چندانی ندارد، زیرا نمی‌توان به طور قطعی تمام موارد ۹۰ درصد را به ا.هیستولیتیکا نسبت داد و سایر گونه هارا نیز مد نظر قرار داد. در نمونه مدفوع این‌گونه افراد معمولاً کیست مشاهده می‌شود و به ندرت تروفوزوئیت‌هایی که در سیتوپلاسم آن‌ها گلبول قرمز وجود دارد، رویت خواهند شد(۱۲،۱۱). به این گونه افراد اصطلاحاً حاملین خاموش می‌گویند که باعث انتشار کیست در محیط می شوند. اگرچه این افراد فاقد علائم بالینی هستند، اما در سرم آن‌ها آنتی‌بادی‌های ضد ا.هیستولیتیکا قابل تشخیص است. در مواردی آمیبیازیس بدون علائم ممکن است به دیسانتری آمیبی و یا فرم خارج روده‌ای آمیبیازیس تبدیل شود ولی در اکثر موارد بیماری خود به خود بهبود می‌یابد(۱۴،۱۳).

۲- دیسانتری آمیبی (کولیت آمیبی):

۴ تا ۱۰ درصد موارد آمیبیازیس بدون علائم زمانی که بیش از یک سال طول بکشد، به دیسانتری آمیبی و یا فرم خارج روده‌ای آمیبیازیس تبدیل می‌شود. بنابراین توصیه می‌شود افراد حامل به درستی شناسایی و درمان شوند. از آن‌جایی که انتاموبا هیستولیتیکا به مخاط کلون تهاجم می‌کند، اغلب اوقات آزمایش خون مخفی مثبت می‌باشد. در موارد آمیبیازیس حاد، بلورهای شارکوت لیدن (Charcot-Leyden) و خون از یافته های شایع در نمونه مدفوع می‌باشند. علاوه بر این در نمونه مدفوع سلول‌های چندهسته‌ای (Polymorphonuclea leukocytes) و ماکروفاژها و گلبول های قرمز دیده می‌شوند. کم‌تر از ۴۰ درصد از افراد مبتلا دچار تب هستند. کولیت پس از درمان دیسانتری آمیبی از یافته‌های نسبتاً شایع می‌باشد که در این حالت ممکن است در نمونه مدفوع کیست یا تروفوزوئیت دیده نشود(۱۶،۱۵). لازم به ذکر است که دیسانتری آمیبی اغلب دارای ویژگی‌هایی است که می‌تواند در تشخیص افتراقی آن از دیسانتریی باکتریایی تا حدودی کمک کننده باشد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: تفاوت های میان دیسانتری آمیبی و دیسانتری باکتریایی (۲۷)

دیسانتری آمیبی	دیسانتری باکتریایی
اغلب دوره کمون بیش از یک هفته	دوره کمون به طور معمول کم تر از یک هفته
اغلب آندمیک	اغلب اپیدمیک
ظهور علائم بیماری به طور معمول تدریجی گاهی برق آسا	ظهور علائم کلنیکی به طور معمول حاد وشدید
در اطفال کم تر دیده می شود	در اطفال بیش تر متداول است
اغلب درد شکم موضعی	اغلب درد شکم منتشر
اغلب بدون تب	اغلب با تب
اغلب بدون ضعف و بی حالی (مگر در موارد بسیار حاد)	اغلب همراه با ضعف و بی حالی
عوارض به شکل های مختلف خونریزی، پریتونیت، آبسه (به خصوص در کبد)	گاهی ایجاد پلی آرتریت
اغلبّ PH مدفوع اسیدی	اغلب PH مدفوع قلیائی
حجم مواد مدفوعی زیاد	حجم مواد مدفوعی کم
اغلب بوی مدفوع مانند بوی ماهی گندیده	بدون وجود چنین بوئی
در مدفوع خون، موکوس، تعداد اندکی لوکوسیت پلی مورف و خرده های سلولی (گاهی به شکل دانه های بلغور) دیده می شود	در مدفوع خون، سلول های چرکی، تعداد زیادی لوکوسیت های پلی مرف دیده می شود
در مدفوع گلبول های قرمز زیاد و بیش تر بصورت آگلوتینه	در مدفوع گلبول های قرمز زیاد، سالم و پراکنده
تروفوزوئیت آمیب در مدفوع قابل روئیت است	تروفوزوئیت دیده نمی شود، گاهی ماکروفاژ شبیه به آمیب هماتوفاژ
وجود کریستال های شارکوت لیدن در ۲۵ درصد از نمونه های مدفوع	کریستال های شارکوت لیدن دیده نمی شود
داروهای ضد آمیب موجب بهبودی بیمار می شوند	داروهای ضد آمیب تاثیری ندارند

۳- آمیبیازیس خارج روده ای یا تهاجمی:

شایع‌ترین شکل آمیبیازیس خارج روده‌ای آبسه‌های کبدی آمیبی (Amoebic Liver Abscess)(ALA) می‌باشد که به عنوان عامل مهمی در مرگ و میر ناشی از ا.هیستولیتیکا است(۱۷). آمیبیازیس خارج روده‌ای با علائمی چون کاهش وزن، لوکوسیتوزیس بدون ائوزینوفیلی، آنمی خفیف، افزایش آلکالین فسفاتاز و افزایش ESR همراه است. لازم به ذکر است تاریخچه‌ای از بیمار (اخیراً به مناطق آندمیک سفر داشته) در تشخیص صحیح کمک کننده است.

مهم‌ترین خطر آبسه‌های آمیبی پاره شدن آن‌هاست، به خصوص اگر در پری کارد قلب باشدکه متعاقب آن معمولاً آلودگی مضاعف باکتریایی وجود خواهد داشت(۱۸). بیش‌ترین پارگی مربوط به آبسه‌هایی است که در ناحیه پرده جنب تشکیل می‌شوند. با

تشخیص و درمان به موقع موارد مرگ و میر ناشی از ALA کم‌تر از ۱یک درصد خواهد بود. آبسه‌های آمیبی می‌توانند در اندام‌های دیگری نظیر مغز، دیافراگم، قلب، دستگاه ادراری تناسلی، ریه، پوست و سایر احشاء دیده شوند. تشخیص آبسه‌های مغزی در نمونه بیوپسی و یا اتوپسی مغز امکان‌پذیر است. اگرچه روش الایزا دارای حساسیت ۹۴ درصد و اختصاصیت ۹۵ درصد برای تشخیص ALA می‌باشد، اما طی ۱۰-۷ روز اول بیماری ممکن است با منفی کاذب همراه باشد، اما معمولاً با تکرار آزمایش نتیجه مثبت می‌شود. سونوگرافی و CT اسکن اختصاصیتی برای تشخیص آبسه‌ها کبدی ندارند. زمانی که امکانات استفاده از PCR در دسترس نباشد، به‌منظور تایید قطعی و تشخیص بهتر به دنبال تست‌های سرولوژی تصاویر رادیوگرافی از نواحی شکمی در تشخیص قطعی کمک‌کننده است. روش PCR در تشخیص ALA دارای حساسیت ۱۰۰ درصد می‌باشد(۲۰،۱۹).

روش های تشخیص آزمایشگاهی

۱- رو ش های میکروسکوپی

روش‌های میکروسکپی بر پایه تهیه گسترش مرطوب، روش‌های تغلیظی (فرمل اتر یا نمک اشباع) و رنگ‌آمیزی دائمی (تری کروم یا هماتوکسیلین– آهن) می‌باشد که تماماً بر روی نمونه مدفوع انجام می‌شود. رنگ‌آمیزی کمک موثری جهت تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار از دیگر آمیب‌های روده‌ای می‌کند. استفاده ازگسترش مرطوب بر روی نمونه تازه برای تشخیص افترافی ۳ گونه فوق از حسایست کم‌تر از ۱۰ درصد برخوردار است، زیرا نمونه‌های مدفوع باید کم‌تر از یک ساعت به آزمایشگاه منتقل و بررسی شوند تا بتوان تروفوزوئیت‌های متحرک را دید(۲۱).

نکته قابل توجه این است که تنها بیمارانی که به فرم آمیبیازیس حاد مبتلا هستند، تروفوزوئیت‌های دارای RBC دفع می‌کنند. در نمونه بیماران بدون علائم معمولاً تنها کیست دیده می‌شود. در چنین حالاتی با استفاده از روش‌های تغلیظی و رنگ‌آمیزی دائمی تشخیص کیست‌ها آسان‌تر است. روش میکروسکوپی برای تعیین گونه‌های آنتاموبا نسبت به کشت انگل و روش‌های‌های تشخیص آنتی ژن از اعتبار کم تری برخوردار است، به‌طوری که حساسیت آن حدود ۶۰ درصد می‌باشد. از آن‌جایی‌که تروفوزوئیت‌ها ظرف مدت یک ساعت در نمونه تازه تحلیل می‌روند، لذا نگه‌داری نمونه در یک ماده فیکس‌کننده ضروری می‌باشد(۲۳،۲۲). بدین‌منظور نمونه‌ها باید در فیکساتیو PVA (پلی وینیل الکل) و یا SAF (سدیم استات– اسید استیک– فرمالین) نگه‌داری شوند. تهیه نمونه مدفوع ۳ نوبت در یک هفته از بیمار در تشخیص حائز اهمیت است و احتمال یافتن عامل بیماری را ۸۵ تا ۹۵ درصد افزایش می‌دهد. عقیده بر این است مشاهده RBC در سیتوپلاسم تروفوزوئیت ا.هیستولیتیکا باعث تفریق افتراقی آن از ا.دیسپار می‌شود، اما در مطالعاتی وجود RBC در سیتوپلاسم ا.دیسپار نیز گزارش شده است(۲۶-۲۴، ۵۹).

۲- روش های کشت

کشت ا.هیستولیتیکا در ۳ نمونه محیط کشت Xenic، Monoxenic و Axenic انجام می‌شود. محیط Xenic که در آن انگل در حضور یک "فلور نامعلوم" رشد می‌کند (به‌طور مثال سرم منعقده). در Monoxenic محیط کشت تنها دارای "یک میکروارگانیسم زنده فعال مشخص" می‌باشد که حضور آن برای رشد انگل ضروری است. Axenic محیط کشت خالص یا بدون همراه می‌باشد، یا به بیان دیگر "فاقد میکروارگانیسم زنده فعال" می‌باشد(۲۸).

این محیط‌ها به ۲ صورت مونوفازی و دی فازی می‌باشند. محیط‌های تک فازی مایع یا جامد هستند. محیط‌های دی فازی فاز جامد در پایین و فاز مایع در بالا می‌باشد. محیط‌های کشت xenic برای ا.هیستولتیکا محیط دی فازی Lock-Egg (LE) محیط کشت مونوفازی

TYSGM-9 و محـیط کشـت Robinson مـی‌باشـند. محیط‌های کشت Axenic برای ا.هیستولیتیکا محیط دیامونـد(TYI-S-33) ، YI-S ، LYS-2 اسـت(۳۰،۲۹). علاوه بر این، محیط کشت مونوفازی TP-S-1 به طور گسترده‌ای در آزمایشگاه‌ها برای کشت ا.هیستولیتیکا استفاده می‌شود. نمونه مورد استفاده برای کشت می‌تواند نمونه مدفوع، نمونه بیوپسی رکتوم و یا نمونه آسپیره شده آبسه‌های کبدی باشد. از آن‌جا که آبسه‌های کبدی در ۹۸ درصد موارد استریل هستند، بنابراین اضافه کردن یک فلور باکتریایی و یا تریپانوزوماتید به محیط کشت Monoxennic و Xenic ضروری می‌باشد(۳۲،۳۱).

بـا ایـن همـه موفقیـت، کشـت ا.هیسـتولیتیکا در آزمایشگاه‌های رفرانس ۵۰ تا ۷۰ درصد می‌باشد. به این خاطر روش کشت گاهاً با منفی کاذب همراه است و از ایـن‌رو روشـی معمـول بـرای تشـخیص ا.هیسـتولیتیکا نمی‌باشد. نتیجه برخی مطالعات نشان می‌دهد کـه محیط YI-S محیط مناسبی برای کشت ا.دیسپار نمـی‌باشـد. بنابراین از ایـن محیط کشت مـی‌تـوان بـرای تشـخیص افتراقـی ا.هیسـتولیتیکا از دیسـپار کمـک‌گرفـت. ا.موشکوفسکی را مـی تـوان در محیط‌هـای TTY-S-B مونوفازیـک همـراه بـا تریپانوزوماتیـد، TP-S-1-GM مونوفازیک، محیط کشت TYI-S-33 Axenic حاوی ۱۰ درصـد سـرم جنـین گـاو (FBS)[1] در ۴ درجـه سـانتی‌گـراد و یـا محیط TYSGM-9 Xenic حـاوی ۵ درصد FBS (Fetal Bovin Serum) در دمـای ۲۴ و یـا ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داد(۳۳).

لازم بـه ذکـر اسـت کـه کشـت ا.هیسـتولیتیکا در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به عنوان یـک روش رایـج امکان‌پذیر نیست و حساسیت آن بـه عنـوان یـک روش شناسایی کم‌تر از روش میکروسکوپی می‌باشد. از سـوی دیگر روش کشت روشی گران، زمان بر و دشوار اسـت. بنابراین استفاده از روش کشت به عنوان یک روش رایج برای شناسایی گونه‌های مختلف آنتاموبا توصیه نمی‌شود و بیش‌تر جنبه تحقیقاتی دارد(۳۴).

۳- بررسی الگوی ایزوآنزیم ها

تفکیـک گونـه‌هـای انتاموبـا بـا اسـتفاده از بررسـی حرکات الکتروفورزی برخی از آنزیم‌هایی کـه در تمـام گونه‌های انتامبـا بـه‌طـور مشـترک وجـود دارد، صـورت می‌پذیرد. با این روش حتی می‌توان سویه‌های یک گونه را نیز تعیین کرد.

بـه هـر گـروه از انگـل هـا کـه دارای آنـزیم‌هـای مشترکی هستند و این آنزیم هـا حرکـات الکتروفـورزی یک سانی دارند، یک "زیمودم" گفتـه مـی‌شـود. انـواع این آنزیم ها شامل مالیک، هگزوکیناز، گلـوکز فسـفات ایزومراز و فسفوگلوکوموتاز می‌باشند(۳۵). بـا ایـن روش تا کنون ۲۴ زیمودم کشف شـده اسـت کـه ۲۱ زیمـودم مربوط به انسان می‌باشـد (۹ زیمـودم ا.هیسـتولیتیکا و ۱۲ زیمودم دیسـپار). قبـل از پیـدایش روش هـای مولکـولی مبتنـی بـر شناسـایی DNA ا.هیسـتولیتیکا، از روش ایزوآنزیمی به عنوان "استاندارد طلایی" بـرای تشـخیص افتراقی ا.هیستولیتیکا از دیسپار استفاده می‌شد.

روش ایزوآنزیمـی معـایبی دارد کـه شـامل سـختی رشد ا.هیستو لیتیکا در محیط کشـت، زمـان بـر بـودن و سـختی انجـام آزمـایش مـی‌باشـد. عـلاوه بـر ایـن نتیجـه آزمایش همیشه رضایت بخش نمی‌باشد، از طرفی گاهاً بررسـی ایزوآنزیمـی بـرای نمونـه‌هـایی کـه از لحـاظ میکروسکوپی مثبت هستند، منفی مـی‌باشـد. ایـن باعـث شده است که از روش‌های ایزوآنزیمی بـه طـور معمـول برای تشخیص آمیب استفاده نشود و با کشف روش‌هایی برای تشـخیص DNA ا.هیسـتولیتیکا، روش ایزوآنزیمـی تقریباً کنار گذاشته شده است(۳۷،۳۶). بـر اسـاس مطالعـه ای که توسط محققـین ایرانـی بـر روی گلـوکز فسـفات ایزومراز در سال ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ انجام شد، وجـود چهـار ژن مختلف از گلوکز فسفات ایزومراز برای گونه انتامبـا هیستولتیکا شناسایی و معرفی شدند . آنها دلیل اخـتلاف حرکت الکتروفورزی چهار زایمـودم انتامبـا هیسـتولتیکا روی ژل نشاسته را با روش مولکولی بیان نمودند(۵۶).

۴- شناسایی آنتی بادی

این روش‌ها برای تشخیص ا.هیستولیتیکا در کشورهای صنعتی که شیوع آمیبیازیس در آن‌ها پایین است، ارزش فراوانی دارد. بدیهی است در مناطق اندمیک به طور قطعی نمی‌توان آلودگی قبلی را از آلودگی جدید تشخیص داد، زیرا افراد مناطق اندمیک دائماً در معرض ابتلا قرار دارند. ارزش واقعی شناسایی آنتی بادی زمانی است که در نمونه مدفوع فرد مشکوک آمیب یافت نشود و فرد به آمیبیازیس خارج روده‌ای مبتلا باشد. به‌طور کلی حساسیت روش‌های شناسایی آنتی بادی ضد ا.هیستولیتیکا در سرم افراد مبتلا به ALA حدود ۱۰۰ درصد گزارش شده است، به عبارت دیگر این روش‌ها در شناسایی افراد مذکور بسیار کارآمد هستند(۳۸). روش‌های تشخیص آنتی‌بادی ضد ا.هیستولیتیکا شامل هماگلوتیناسیون غیر مستقیم (Indirect Hemagglutination, IHA)، آگلوتیناسیون لاتکس (Latex Agglutination)، ایمونوالکتروفورز، کانتر ایمونوالکتروفورز CIE، (Counter Immuno Electrophoresis)، ایمونودیفیوژن، فیکساسیون کمپلمان، ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم (Indirectimmuno, IFAFluorescence Assay) و الایزا (ELISA) می‌باشند(۳۹). در بین آزمایشات نام برده شده روش فیکساسیون کمپلمان نسبت به بقیه روش‌ها از حساسیت کم‌تری برخوردار است و به علاوه پرهزینه می‌باشد. به این دلیل در بسیاری از آزمایشگاه‌ها انجام نمی‌شود. در تست کانتر ایمونوالکتروفورز آنتی ژن آنتامبا هیستولیتیکا با سرم غیرفعال شده در پلیت آگارز ۱ درصد واکنش می‌دهد. مشاهده باند رسوبی علیه آنتی‌ژن آنتامبا هیستولیتیکا در سرم بیماران مبتلا به آمیبیازیس به عنوان واکنش مثبت و عدم تشکیل باند رسوبی به‌عنوان واکنش منفی تلقی می‌شود. تست هماگلوتیناسیون غیر مستقیم به سادگی قابل انجام است، اختصاصیت ۹۹/۱ درصد است، البته حساسیت پایین آن باعث منفی کاذب می‌شود. آگلوتیناسیون لاتکس از حساسیت و اختصاصیت شبیه به IHA برخوردار است. روش CIE نیز در تشخیص آمیبیازیس خارج روده‌ای ارزش بالایی دارد (حساسیت ۱۰۰ درصد) اما بسیار زمان بر است(۴۰). هم‌چنین روش IFA سریع و معتبر می‌باشد، توسط آن می‌توان ALA را از عوامل دیگر ایجاد کننده آبسه‌های کبدی و نیز عفونت قبلی را از عفونت جدید افتراق داد. حساسیت IFA ۹۳/۶ درصد و ویژگی آن ۹۶/۷ درصد می باشد که روش بهتری نسبت به الایزا به نظر می‌رسد. روش الایزا دارای حساسیت ۹۷/۹ درصد و اختصاصیت ۹۴/۸ درصد برای تشخیص آنتی‌بادی ضد ا.هیستولیتیکا در افراد دچار ALA می‌باشد. تشخیص صحیح عفونت حاد برای درمان بیماران مبتلا به آمیبیازیس تهاجمی، بسیار حیاتی است. این تشخیص براساس وجود IgG یک هفته پس از عفونت یا وجود IgM ضد آنتامبا هیستولیتیکا مخصوصا در هفته اول کولیت آمیبی استوار است. بیماران مبتلا به آنتامبا دیسپار نیز گاهی اوقات تیتر آنتی‌بادی ضد آمیبی دارند(۴۲،۴۱).

۵- شناسایی آنتی ژن

برای این منظور کیت‌هایی به صورت تجاری موجود است (جدول شماره ۲) که با روش‌های مختلف از جمله الایزا می‌توان آنتی ژن‌های اختصاصی ا.هیستولیتیکا که شامل Gal/GalNAc (که یک لکتین اختصاصی ا.هیستولیتیکا است)، آنتی ژن غنی از سرین، یک lipophospholglycan (LPG)، یک لکتین چسبنده ۱۷۰ کیلودالتونی در بزاق) را با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال شناسایی نمود داد. از بین آنتی‌ژن‌های فوق Gal/GalNAc برای ا.هیستولیتیکا اختصاصی بوده و برای تشخیص تفریقی ا.هیستولیتیکا از ا.دیسپار مفید می‌باشد. این نکته مهم است که استفاده از مواد فیکساتیو در نمونه مدفوع باعث دناتوره شدن این آنتی‌ژن‌ها می‌شود و کمی تشخیص را دچار مشکل می‌کند. بنابراین برای تشخیص آنتی ژن نمونه مدفوع باید تازه و یا فریز شده باشد. ارزش تشخیصی آنتی ژن‌های

اختصاصی ا.هیستولیتیکا در نمونه مدفوع بسیار بیش تر از روش کشت و مشاهده میکروسکوپی است(۴۳). هر چند در برخی مطالعات که حساسیت روش الیزا با PCR را در افتراق ا.هیستولیتیکا از ا.دیسپار بررسی نمودند، حساسیت روش PCR را، ۱۰۰ برابر بیش‌تر از روش الایزا بیان نمودند. حساسیت و اختصاصیت روش real-time PCR برای تشخیص ا.هیستولیتیکا به ترتیب ۹۶ و ۱۰۰ درصد می‌باشد. با تمام پیشرفت‌هایی که در زمینه تشخیص آنتی‌ژن‌های ا.هیستولیتیکا صورت گرفته اما هنوز تست تشخیص آنتی ژنی برای ا.دیسپار و موشکوفسکی در نمونه‌های بالینی طراحی نشده است. علاوه بر نمونه مدفوع لکتین ا.هیستولیتیکا را می‌توان در نمونه آبسه کبدی و یا نمونه سرم تشخیص داد. هر چند حساسیت این روش ۳۳ درصد برای نمونه‌های سرم و ۴۱ درصد برای آبسه‌های کبدی می‌باشد. تشخیص آنتی‌ژن‌های اختصاصی ا.هیستولیتیکا و ا.دیسپار به روش الایزا برای مطالعات اپیدمیولوژی و درمانگاهی هنگامی که امکان استفاده از روش PCR فراهم نباشد، می‌تواند مفید واقع شود(۴۴). از میان روش‌های ذکر شده در بالا تنها روش تشخیص آنتی‌ژن با روش الایزا سریع و به سادگی انجام می‌شود، بنابراین انجام آن در آزمایشگاه‌ها برای تشخیص ا.هیستولیتیکا توصیه می شود زیرا کیت‌های آن به صورت تجاری در بازار موجود می‌باشند. در مجموع روش‌های سرولوژی در کنار روش‌های شناسایی آنتی ژن و PCR بهترین راه برای تشخیص آمیبیازیس می‌باشند.

جدول شماره ۲: برخی کیت های تجاری موجود برای شناسایی آنتی ژن و یا آنتی بادی در آمیبیاز (۲۶،۴۵)نام کیت

نوع آزمایش	کارخانه سازنده شرکت توزیع کننده /	
ELISA	Alexon-Trend	Amoebiasis
ELISA	Chemicon	Amoebiasis
ELISA	IVD Research	Amoebiasis
ELISA	Sigma Diagnostics	Amoebiasis
ELISA	Alexon-Trend	ProSpecT
ELISA	Cellabs	Entamoeba-CELSA
ELISA	TechLab	*E. histolytica*
ELISA	Wampole	*E. histolytica*

۶- روش سریع ایمونوکروماتوگرافی

هدف از ایمونوکروماتوگرافی شناسایی آنتی‌ژن‌های انگل می‌باشد. در این روش می‌توان از نوارهای کاغذی از پیش طراحی شده به صورت کیت برای تشخیص هم زمان ژیاردیا، کریپتوسپوریدیوم، ا.هیستولیتیکا و ا.دیسپار استفاده کرد. از نوارهای کاغذی استفاده می‌شود که با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد آنتی ژن‌های اختصاصی انگل‌های نام برده پوشیده شده اند. این آنتی‌ژن‌ها شامل آنتی‌ژن سطحی ۲۹ کیلودالتونی (ا.هیستولیتیکا/ا.دیسپار)، آلفا-۱-ژیاردین (ژیاردیا) و پروتئین دی سولفید ایزومراز (کریپتوسپوریدیوم پاروم) می‌باشند. در مطالعات مختلف حساسیت این روش را ۶۸/۳ تا ۱۰۰ درصد و اختصاصیت آن را ۹۹/۱ تا ۱۰۰ درصد گزارش کرده‌اند. برتری این روش این است که حدود ۱۵ دقیقه قابل انجام است و بر روی نمونه‌های مدفوع تازه و یا فریز شده قابل انجام است. در سایر نمونه‌ها نظیر بزاق، سرم و مایع آبسه نیز می‌توان آنتی‌ژن آمیبی را جستجو کرد. مشکل مهم این تست این است که ا.هیستولیتیکا را نمی‌توان از ا.دیسپار تشخیص داد(۴۷،۴۶).

۷- روش‌های تشخیصی مبتنی بر DNA (آنالیز شایزودمی)

۱-۷-روش های استخراج DNA

روش‌های استخراج DNA از نمونه مدفوع به این صورت است که نمونه‌هایی را که از لحاظ میکروسکوپی مثبت هستند در محیط کشت رابینسون کشت می‌دهند و از انگل کشت داده شده با روش فنل-کلروفرم استخراج می‌کنند. بعدها توانستند DNA انگل را به طور مستقیم، از نمونه‌هایی که از لحاظ میکروسکوپی مثبت بودند، بدون کشت انگل نیز استخراج کنند. در سال‌های بعد، توانستند از تمام اشکال نمونه مدفوع (تازه، فیکس شده در الکل، رنگ‌آمیزی شده، نگه داری شده در ۱۰- و یا ۲۰- درجه سانتی‌گراد) DNA انگل را نیز جدا کنند. امروزه کیت‌های تجاری استخراج DNA به فراوانی در دسترس هستند(۴۸). بر ای استخراج DNA از نمونه

مدفوع کیت‌های تشخیصی به صورت تجاری موجود می‌باشند. برای مثال کیت QIAamp برای استخراج DNA با کارائی بالایی همراه است. برای استخراج DNA زمان از اهمیت بالایی برخوردار است به طوری که انتقال نمونه‌های مدفوع بدون ماده نگه دارنده به آزمایشگاه در مناطق آب و هوایی گرم ممکن است باعث از بین رفتن انگل و در نتیجه تحلیل DNA شود. نمونه‌های دارای فیکساتیو باعث کاهش حساسیت PCR می‌شود. با توجه به مطالب گفته شده قرار دادن نمونه‌های تازه (بدون فیکساتیو) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد بهترین نتیجه را در انجام آزمایش PCR به همراه خواهد داشت(۴۸).

۲-۷- انواع روش های PCR

الف - Conventional PCR

سازمان بهداشت جهانی استفاده از PCR را به عنوان ابزاری کارآمد برای بررسی‌های اپیدمیولوژی و تشخیص بالینی می‌باشد، توصیه کرده است. استفاده از PCR برای تعیین زیر واحد کوچک ژن rRNA (18s rDNA) ا.هیستوایتیکا ۱۰۰ برابر حساس‌تر از شناسایی انگل با روش الایزا می باشد. امروزه روش‌های مختلفی برای PCR وجود دارد که به وسیله آن‌ها می‌توان ۳ گونه انتاموبا (ا.هیستولیتیکا، ا.دیسپار و ا.موشکوفسکی) را از هم تفریق داد. هر چند استفاده از PCR روش مطمئنی به حساب می‌آید، اما گران و زمان بر می‌باشد(۴۹).

ب -Real-time PCR

مزایای روش real time نسبت به Conventional این است که در هزینه مواد تا حدودی صرفه جویی می‌شود و از طرفی احتمال مثبت کاذب به دلیل تکثیر DNA میکروارگانیسم‌های دیگر موجود در نمونه کاهش می‌یابد. در این روش از یک یا دو شناساگر (Probe) نشاندار شده با مواد فلوئورسنت استفاده می‌شود. لذا در طول انجام PCR می‌توان به طور مداوم ایجاد محصول را مشاهده نمود. از دیگر مزایا حساسیت بالای real time می‌باشد به‌طوری‌که قادر به شناسایی ۰/۱ از انگل در هر گرم از نمونه مدفوع می‌باشد(۵۰). از آن‌جایی که real time یک روش کمی است، می‌توان تعداد انگل را در نمونه‌های مختلف تعیین کرد. امروزه با استفاده از real time می‌توان ا.هیستولیتیکا را از ا.دیسپار تفکیک کرد. اما با این تفاسیر روش real time نسبت به مشاهده میکروسکوپی نمونه مدفوع و تست‌های تشخیص آنتی ژنی، روش گرانی است. بنابراین در مناطقی از دنیا که شیوع آمیبیازیس بالا است و توان مالی چندانی هم ندارند، استفاده از real time روش با صرفه‌ای نمی‌باشد. در برخی کشورهای پیشرفته، به دلیل شیوع رفتارهای پرخطر مانند همجنس‌گرایی در مردان، آمیبیازیس شیوع نسبتاً بالایی داشته و برا ی تشخیص روش real time توصیه می‌شود(۵۱).

ج- روش Microarray

این روش که یک روش نوین با کاربردهای وسیع می‌باشد، روشی سریع و حساس می‌باشد. این روش از ۴ مرحله تشکیل شده است که شامل استخراج DNA ژنومی، تکثیر توالی مورد نظر در DNA، اتصال یک اولیگونوکلئوتید نشان دار و در نهایت خواندن نتیجه می‌باشد. از این روش هم برای تشخیص و هم برای مطالعات اپیدمیولوژی می‌توان استفاده کرد. هرچند از این روش به ندرت در آزمایشگاه‌ها استفاده می‌شود، اما این روش برای تمایز ا.هیستولیتیکا از ا.دیسپار روش مناسبی می‌باشد(۵۲).

د- روش های تایپینگ (Typing)

تعیین این که آیا سویه یا سویه‌های خاصی از ا.هیستولیتیکا مسئول ایجاد اشکال مختلف آمیبیازیس هستند، اهمیت زیادی دارد. البته صرف نظر از قدرت بیماریزایی (ویرولانس) ا.هیستولیتیکا، عواملی چون ژنتیک میزبان، ایمنی، فلور نرمال روده و تغذیه در ایجاد اشکال مختلف آمیبیازیس نقش دارند. به این خاطر WHO پیشنهاد کرد تا زیر گروه های انتاموبا هیستولیتیکا

در صورت وجود شناسایی شوند کـه ایـن مـی توانـد بـه برخی سوالات در مورد ویـرولانس ا.هیسـتولیتیکا پاسـخ دهد(۵۳). هم‌چنین برای شناسایی گونه های ا.هیستولیتیکا می توان از روش دیگری به نـام microsatellite typing نیز استفاده کرد.

Microsatellite یا قمر های کوچـک اصـطلاحاً بـه توالی‌های یکسـان کـه بـر روی ژنـوم انگـل بـه صـورت پراکنـده وجـود دارنـد، گفتـه مـی‌شـود کـه بـا سـایر موجـودات متفـاوت اسـت. از ایـن روش در انگشـت نگـاری DNA (DNA fingerprinting) نیـز اسـتفاده می‌شود(۵۴).

ه- روش (Loop Mediated Isothermal Amplification LAMP)

روش LAMP کـه یـک روش تـک دمـایی اسـت، تکنیکی ساده، نـوین، ارزان و سـریع (حـدود ۹۰ دقیقـه) اسـت. در ایـن روش کـه معمـولاً از ۳-۲ جفـت پرایمـر استفاده می‌شود، نیازی به ترموسایکلر نـدارد. امـا تفسـیر نتایج و طراحی مناسـب پرایمرهـای آن مهـارت ویـژه‌ای نیـاز دارد. روش مـذکور ابـزار تشخیصـی بـا ارزشـی در مطالعات اپیدمیولوژیک در کشورهایی که آمیبیازیس به صـورت آنـدمیک وجـود دارد، مـی‌باشـد. ایـن روش می‌تواند در نمونه‌های مدفوعی ا.هیسـتولیتیکا و ا.دیسـپار را از هم افتراق دهد. روش LAMP حساسیت و ویژگـی بالایی مشابه Nested PCR در تشخیص آمیبیـازیس دارد. توانایی شناسایی حداقل یک انگل در هر واکـنش را دارد. به هر حال استفاده از این روش تشخیصی سـریع و نسـبتا ساده به منظور تخمین میزان بار انگلـی (شـیوع عفونـت) ا.هیستولیتیکا در شرایط فیلد نیاز به بررسی‌های بیش‌تـری دارد(۵۵).

۸- روش های تصویر برداری

آبسه‌های آمیبی، شـایع‌تـرین تظـاهر خـارج روده‌ای آمیب هیستولیتیکا است که ۷-۳ درصد افراد مبتلا به نوع رودهـای دچـار آن مـی‌شـوند. نمـای سـونوگرافی ایـن آبسه‌ها به صورت توده‌های گرد یا بیضی با حدود کاملا مشـخص کـه در محـیط کبـد قـرار گرفتـه‌انـد و حـاوی Low-level internal enhancement هموژن مـی‌باشـد. آسپیراسیون آبسه‌های کبدی با هدایت پروب سـونوگرافی، در مواردی مانند عدم پاسخ بـه درمـان، عفونـت ثـانوی باکتریـایی، حـاملگی و مشـکوک شـدن بـه آبسـه‌هـای تومـوری انجـام مـی‌شـود. آمبومـا (Amoeboma) یـا گرانولوم آمیبی، که به دنبال تهاجم مکرر فـرم هماتوفـاز بـه دیـواره روده بـزرگ بـه وجـود مـی‌آیـد، را معمـولا می‌توان با روش‌هـای تصـویربرداری (سـی تـی اسـکن)، MRI (Magnetic Resonance Imaging) ویـا بـاریم تنقیه (انما) و کولونوسـکوپی شناسـایی نمـود، امـا بـرای تشخیص قطعی آن و افتراق از آدنوکارسینومای کولـون و سایر موارد تشخیص افتراقی بیوپسی از ضایعه ضروری است(۵۶).

۹- *تلقیح به حیوانات حساس آزمایشگاهی*

در مطالعـات هیسـتوپاتولوژی و ایجـاد بیمـاری بـه صورت تجربی در حیوان معمولا از تلقـیح بـه هامسـتر و تولید آبسه در کبد آن استفاده می‌شود(۵۶).

- *مطالعات تشخیصی انجام شده در ایران*

در این بخش به مطالعات منتشـر شـده در خصـوص تشـخیص آزمایشـگاهی آمیبیـاز و روش‌هـای تایپینـگ آمیب در ایران اشاره خواهد شد.

در بررسـی نمونـه‌هـای حـاملین سـالم در سـال‌هـای ۱۹۹۸ و ۱۹۹۹ توسط حقیقی و همکـاران در شـهر بنـدر عبـاس صـورت گرفـت. میـزان ابـتلا بـه ا.هیسـتولیتیکا و ا.دیسپار با روش میکروسکوپی ۵/۳ درصد شناسایی شد. با روش الایزا ۱۵/۶ درصـد آن‌هـا ا. هیسـتولیتیکا و ۸۴/۴ درصد ا.دیسپار گزارش شد(۵۶). طی مطالعه ای در سـال ۲۰۰۵ نتیجه بررسی نمونه مدفوع افراد ۲ سـال بـه بـالا از سراسر ایران با روش‌های میکروسکوپی را ۱ درصد ابتلا به ا.هیستولتیکا گزارش کردنـد(۵۶). در مطالعـه‌ای کـه ۷ آزمایشـگاه در منـاطق مختلـف تهـران و کـرج در سـال

۱۳۸۱ انجام دادند، تعداد ۵۳ مورد دیسانتری آمیبی و ۱۸ مورد دیسانتری غیر آمیبی گزارش شده توسط بخش انگل شناسی آزمایشگاه های مراکز درمانی، هم زمان با سه روش گسترش مستقیم، رنگ آمیزی تریکروم و کشت در محیط سرم منعقده، مورد بررسی مجدد قرار گرفت. از ۵۳ مورد دیسانتری آمیبی گزارش شده توسط آزمایشگاه ها، تنها ۱۲ مورد (۲۲/۶ درصد) مثبت واقعی و ۴۱ مورد (۷۷/۴ درصد) مثبت کاذب بودند و گزارش تمامی ۱۸ مورد دیسانتری غیر آمیبی نیز صحیح بود و منفی کاذب مشاهده نشد(۵۶). در اولین مطالعه مولکولی که با روش PCR بر روی ۱۵ ایزوله ا.هیستولتیکا/ا.دیسپار توسط فلاح و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش شد، همه ۱۵ ایزوله میکروسکوپی مثبت، ا.دیسپار شناسایی شدند(۵۷).

هوشیار و همکاران در سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۱ در مناطق شهری و روستایی شمال، مرکز و جنوب ایران در نمونه مدفوع افراد بدون علائم انجام دادند و میزان آلودگی به دو گونه‌ی ا.هیستولتیکا/ا.دیسپار با روش‌های میکروسکوپی را ۲۲۶ مورد (۱/۳۶ درصد) گزارش نمودند. نتیجه بررسی تعداد ۱۰۱ مورد از ایزوله‌های میکروسکوپی مثبت با روش PCR-RFLP، ۴/۹ درصد ا.هیستولتیکا، ۹۲/۱ درصد ا.دیسپار و ۳ درصد آلودگی توام به هر دو گونه ا.هیستولتیکا/ا.دیسپار گزارش شد(۵۸).

سلیمانی محمدی و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مطالعه ای بر روی نمونه مدفوع افرادی بدون علائم کلینیکی از استان‌های لرستان، آذربایجان و گلستان میزان آلودگی به ا.هیستولتیکا/ ا.دیسپار را با روش میکروسکوپی ۸۸ مورد (۸/۴ درصد) گزارش کردند. آن‌ها در خود با روش PCR به هیچ مورد مثبتی از ا.هیستولتیکا برخورد نکردند و همه ۸۸ ایزوله ا.دیسپار شناسایی شدند و یک مورد از آن‌ها (۱/۱ درصد) آلودگی توام ا.دیسپار/ ا.موشکوفسکی بود(۵۹).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۵ با هدف افتراق دو گونه با روش‌های آنالیز زایمودم‌ها و PCR بر روی نمونه مدفوع در بیماران مبتلا به علائم گوارشی در استان های فارس، بوشهر و خوزستان انجام داد، با روش‌های میکروسکوپی و PCR تنها ۲۳ مورد آلودگی به دو گونه ا.هیستولتیکا / ا.دیسپار شناسایی نمود که ۶ مورد آن ها ا.هیستولتیکا (۲۶ درصد) و ۱۷ مورد ا.دیسپار (۷۴ درصد) بود(۵۶). طی مطالعه ای در سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۵ در بیماران با علائم کلینیکی دل درد و اسهال که به بیمارستان طالقانی تهران مراجعه کرده‌اند، با روش‌های میکروسکوپی ۵ مورد (۱/۱ درصد) ابتلا به ا.هیستولتیکا/ ا.دیسپار گزارش نمودند. با PCR چهار مورد آن‌ها ا.هیستولتیکا شناسایی شد و یکی از نمونه‌های مثبت PCR نشد. در این مطالعه ا.هیستولتیکا در بیماران مورد بررسی دیده نشد(۵۶).

بر اساس مطالعه ای که در سال‌های ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۷ در مراکز درمانی تهران انجام گرفت، تعداد ۲۷ مورد (۱/۶ درصد) ا.هیستولتیکا/ ا.دیسپار با روش میکروسکوپی شناسایی شد. تعداد ۲۲ مورد از ایزوله‌های مثبت PCR شدند که تنها یک مورد (۴/۵ درصد) ا.هیستولتیکا بود و ۲۱ مورد (۹۵/۵ درصد) ا.دیسپار گزارش شدند(۵۶). در مطالعه انجام شده برروی نمونه مدفوع بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی زاهدان، گنبد و تهران با روش های مختلف میکروسکوپی، PCR و مولتیپلکس PCR، تنها ۵۸ بیمار (۱/۵۲ درصد) با روش‌های میکروسکوپی مبتلا به سه تک یاخته ی ا.هیستولتیکا/ ا.دیسپار و یا ا.موشکوفسکی بودند. با M-PCR ۵۳ مورد ا.دیسپار (۹۱/۳۷ درصد)، دو مورد (۳/۴۵ درصد) ا.هیستولتیکا، دو مورد (۳/۴۵ درصد) ا.موشکوفسکی و یک مورد (۱/۷۲ درصد) آلودگی توام ا.دیسپار و ا.موشکوفسکی به دست آمد(۶۰).

در بررسی نمونه مدفوع بیماران با اختلالات گوارشی، اولین مطالعه در سال‌های ۱۹۸۸ تا ۱۹۹۹ توسط حقیقی و رضائیان بروی نمونه سرم بیماران مشکوک به آمیبیازیس روده‌ای و خارج روده‌ای که از مراکز درمانی تهران به آزمایشگاه تک یاخته شناسی روده‌ای

دانشکده بهداشت تهران ارسال شده بود، انجام شد. در این مطالعه با استفاده از الایزا ، ۱۴ نمونه (۲۱/۵ درصد) مثبت و عیار آنتی بادی بالاتر از عیار تشخیصی (cut-off) بود(۶۱).

با توجه به مطالب ارائه شده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که از میان روش‌های تشخیصی مختلف، روش‌های میکروسکوپی (به دلیل عدم افتراق گونه‌های مختلف آمیب) و سرولوژی (شناسایی آنتی‌بادی) (به دلایل گوناگون از جمله عدم تفکیک عفونت فعلی از گذشته و واکنش‌های متقاطع و غیره) علی‌رغم کاربرد وسیع در مناطق آندمیک به خصوص کشورهای در حال توسعه، کارآیی لازم را ندارند. از سوی دیگر روش شناسایی آنتی ژن در نمونه‌های مدفوع و یا آبسه کبدی در مناطق آندمیک و یا مناطقی که امکان انجام روش‌های مولکولی نیست، بسیار ارزشمند است، اما به دلیل این که حساسیت این روش بسیار کم‌تر از روش PCR بوده و برخی از مطالعات واکنش متقاطع بین آنتی‌ژن‌های گونه‌های مختلف انتاموبا را گزارش کرده‌اند. لذا توسعه و کاربرد روش‌های معمول و نوین مولکولی علاوه بر تشخیص صحیح و زودرس می‌تواند از مصرف بی‌رویه و نادرست دارو و ایجاد سوش‌های مقاوم به دارو جلوگیری نماید(۶۳،۶۲).

References

1. Clark CG, Diamond LS. Ribosomal RNA genes of ‘pathogenic’ and ‘nonpathogenic’ *Entamoeba histolytica* are distinct. Mol Biochem Parasitol 1991; 49(2): 297-302.
2. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. J Clin Microbiol 2007; 45(3): 1035-1037.
3. Haque R, Ali I, Clark C, Petri W. A case report of *Entamoeba moshkovskii* infection in a Bangladeshi child. Parasitol 1998; 47(3): 201-202.
4. Haque R, Petri WA. Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. Arch Med Res 2006; 37(2): 273-276.
5. World Health Organization. World Health Organization/Pan American Health Organization/ UNESCO report of a consultation of experts on amoebiasis. Week Epidemiol Rec 1997; 72(14): 97-100.
6. Stanley S, Becker A, Kunz-Jenkins C, Foster L, Li E. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87(13): 4976-4980.
7. Mondal D, Petri WA, Sack RB, Kirkpatrick BD, Haque R. Entamoeba histolytica-associated diarrheal illness is negatively associated with the growth of preschool children: evidence from a prospective study. Trans R Soc Trop Med Hyg 2006; 100(11): 1032-1038.
8. Haque R, Ali IKM, Clark CG, Petri WA. A case report of *Entamoeba moshkovskii* infection in a Bangladeshi child. Parasitol 1998; 47(3): 209-211.
9. Parija SC, Khairna K. *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in Pondicherry. J Health Popul Nutr 2005; 23(3): 292-295.
10. Huston CD, Petri WA. Amebiasis: clinical implications of the recognition of *Entamoeba dispar*. Curr Infect Dis Rep 1999, 1(5): 441-447.
11. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis 1986; 8(2): 228-238.

12. Stanley SL. Amoebiasis. Lancet 2003; 361(9362): 1025–1034.
13. Blessmann J, Van Linh P, Nu PA, Thi HD, Muller-Myhsok B, Buss H, et al. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. Am J Trop Med Hyg 2002; 66(5): 578-583.
14. Blessmann J, Van A Le, Tannich E. Epidemiology and treatment of amebiasis in Hue, Vietnam. Arch Med Res 2006; 37(2): 270-272.
15. Mhlanga BR, Lanoie LO, Norris HJ, Lack EE, Connor DH. Amebiasis complicating carcinoma as a diagnostic dilemma. Am J Trop Med Hyg 1992; 46(6): 759-764.
16. Mondal D , Haque R, Sack RB, Kirkpatrick BD, Petri WA Jr. Attribution of malnutrition to cause-specific diarrheal illness: evidence from a prospective study of preschool children in Mirpur, Dhaka, Bangladesh. Am J Trop Med Hyg 2009; 80(5): 824-826.
17. Boonyapisit S, Chinapak O, Plengvait U. Amoebic liver abscess in Thailand, clinical analysis of 418 cases. J Med Assoc Thai 1993; 76(5): 243-246.
18. Rustgi AK, Richter JM. Pyogenic and amebic liver abscess. Med Clin N Am 1989; 73(4): 847-858.
19. Solaymani-Mohammadi S, Lam MM, Zunt JR, Petri WA. *Entamoeba histolytica* encephalitis diagnosed by PCR of cerebrospinal fluid. Trans R Soc Trop Med Hyg 2007; 101(3): 311-313.
20. Takahashi T, Gamboa-Dominguez A, Gomez-Mendex T, Remes J, Martinez-Gonzalez D, et al. Fulminant amebic colitis: analysis of 55 cases. Dis Colon Rectum 1997; 40(11): 1362-1367.
21. Huston CH, Haque R, Petri WA. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. Expert Rev Mol Med 1999; 1: 1-11.
22. Gonzalez-Ruiz A, Haque R, Aguire A, Castanon G, Hall A, Guhl F, et al. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. J Clin Pathol 1994; 47(3): 236-239.
23. Haque R, Ali IK, Akther S, Petri WA. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J Clin Microbiol 1998; 36(2): 449-452.
24. Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA. Rapid diagnosis of *Entamoeb*a infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. J Clin Microbiol 1995; 33(10): 2558-2561.
25. Pillai DR, Keystone JS, Sheppard DC, MacLean JD, MacPherson DW, Kain KC. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of non endemicity. Clin Infect Dis 1999; 29(5): 1315-1318.
26. Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 4th ed. Washington DC: ASM press; 2001: 761-779.
27. Edrissian Gh H, Rezaeian M, Ghorbani M, Keshavarz H, Mohebali M. Medical protozoology, 1th ed. Tehran: Tehran University of Medical Sciences publisher, 2007. (Persian)
28. Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clin Microbiol Rev 2002; 15(3): 329-341.
29. Visvesvara G S and Garcia L S. Culture of Protozoan Parasites. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(3): 327–328.

30. Diamond LS. A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen dwelling protozoa. Parasitol 1982; 68(5): 958-959.
31. Blessmann J, Le Van A, Tannich E. Epidemiology and treatment of amebiasis in Hué, Vietnam. Arch Med Res 2006; 37(2): 270-272.
32. Wang LT, Jen G, Cross JH. Establishment of *Entamoeba histolytica* from liver abscess in monoxenic cultures with hemoflagellates. Am J Trop Med Hyg 1973; 22(1): 30-32.
33. Diamond LS. Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903: from xenic to axenic cultivation. JProtozool 1986; 33(1): 1-5.
34. Taylor AER, Baker JR. Methods of cultivating of parasites invitro. London: Academic Press; 1978.
35. Sargeaunt PG, Jackson TF, Wiffen S, Bhojnani R, Williams J, Felmingham D, et al. The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical laboratory diagnosis. Arch Investig Med 1987; 18(2): 69-75.
36. Gonzalez-Ruiz A, Haque R, Aguire A, Castanon G, Hall A, Guhl F, et al. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. J Clin Pathol 1994; 47(3): 236-239.
37. Haque R, Faruque AS, Hahn P, Lyerly DM, Petri WA. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. J Infect Dis 1997; 175(3): 734-736.
38. Zengzhu G, Bracha R, Nuchamowitz Y, Cheng W, Mirelman D. Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 1999; 37(9): 3034-3036.
39. Hung CC, Chen PJ, Hsieh SM, Wong JM, Fang CT, Chang SC, et al. Invasive amoebiasis: an emerging parasitic disease in patients infected with HIV in an area endemic for amoebic infection. AIDS 1999; 13(17): 2421-2428.
40. Jackson TF, Anderson CB, Simjee AE. Serological differentiation between past and present infection in hepatic amoebiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1984; 78(3): 342-345.
41. Braga LL, Mendonca Y, Paiva CA, Sales A, Cavalcant AL, Mann BJ. Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in northeastern Brazil. J Clin Microbiol 1998; 36(10): 3044-3045.
42. Randall GR, Goldsmith RS, Shek J, Mehalko S, Heyneman D. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Entamoeba histolytica* antigen in faecal samples. Trans R Soc Trop Med Hyg 1984; 78(5): 593-595.
43. Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. J Clin Microbiol 1997; 35(9): 2405-2407.
44. Haque R, Mollah NU, Ali IK, Alam K, Eubank A, Luerly D, et al. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. J Clin Microbiol 2000; 38(9): 3235-3239.
45. Markell EK, John DT, Krotoski WA. Markell and Voges Medical Parasitology, 8th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999.

46. United States Centers for Disease Control and Prevention. Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract.Approved guideline M28-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 1997.
47. Lebbad M, Svard SG. PCR differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from patients with amoeba infection initially diagnosed by microscopy. Scand J Infect Dis 2005; 37(9): 680-685.
48. Verweij JJ, Van Lieshout L, Blotkamp C, Brienen EA, Van Duivenvoorden S, Van Esbroeck M, et al. Differentiation *of Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* using PCR-SHELA and comparison of antibody response. Arch Med Res 2000; 31(suppl 4): 44-46.
49. Hamzah Z, Petmitr S, Mungthin M, Leelayoova S, Chavalitshewinkoon-Petmitr P. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. J Clin Microbiol 2006; 44(9): 3196-3200.
50. Blessmann J, Buss H, Nu P, Dinh B, Ngo Q, Van A, et al. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. J Clin Microbiol 2002; 40(12): 4413-4417.
51. Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway B, Visvesvara G, Sriram R, et al. Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. J Clin Microbiol 2005; 43(11): 5491-5497.
52. Wang Z, Vora GJ, Stenger DA. Detection and genotyping of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* by oligonucleotide microarray. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3262-3271.
53. Jackson TF, Suparsad S. Zymodeme stability of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. Arch Med Res 1997; 28: 304-305.
54. Ali IK, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri WA, Haque R, et al. Entamoeba moshkovskii infections in children, Bangladesh. Emerg Infect Dis 2003; 9(5): 580-584.
55. Liang SY, Chan YH, Hsia KT, Lee JL, Kuo MC, Hwa KY, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of entamoeba histolytica. J Clinical Microbiol 2009; 47(6): 1892-1895.
56. Haghighi A. Amoeba and Amoebiasis. 1th ed, Armaghaneghalam Publisher; 2011. p. 97-116. (Persian).
57. Fallah M, Haghighi A, Tachibana H. Preliminary comparative study of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar by PCR technique in Iran. Medical J Islamic Rep Iran 2001; 14(4): 369-372.
58. Hooshyar H, Rezaian M, Kazemi B. Distribution and differential diagnosis of Entamoeba histolytica from Entamoeba dispar by the RFLP-PCR method in centeral Iran. Ann Saudi Med 2003; 23(6): 363-366.
59. Soleymani-Mohamamadi Sh, Rezaian M, Babaei Z, Rajabpour A, Meamar AR, Pourbabai AA, et al. Comparison of stool antigen detection kit and PCR for diagnosis of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in fections in asymptomatic cyst passers in Iran. J Clin Microbiol 2006; 44(6): 2258-2261.
60. Mojarad E, Nochi M, Sahebekhtiari N, Rostami Nejad M, Dabiri H, Haghighi A. Characterization of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in fresh stool by PCR.

Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench 2010; 3(3): 37-41.

61. Haghighi A, Rezaian M. Detection of serum anibody to Entamoeba histolytica in various population samples of amebic infection using an enzyme immunosorbent assay. Parasitol Res 2005; 97(3): 209-212.
62. Bansal, D, Sehgal R, Chawla Y, Mahajan R, Malla N. In vitro activity of antiamoebic drugs against clinical isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2004; 21(3): 23-27.
63. Martinez-Palomo A, Martinez-Baez M. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. X. Amebiasis. Rev Infect Dis 1983; 5(6): 1093-1102.