تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار (ایزوله‌های تهران) با روش PCR-RFLP

حسین هوشیار M.S.P.H[☆♦]، مصطفی رضائیان Ph.D.[☆]، بهرام کاظمی Ph.D.[★]، علی حقیقی Ph.D.[★]

☆ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه انگل‌شناسی و قارچ شناسی

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی، بخش بیولوژی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

چکیده

* **هدف:** تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا (بیماریزا) و انتامبا دیسپار (غیر بیماریزا) جدا شده در تهران و نشان دادن اختلاف آنها با استفاده از روش PCR-RFLP(Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Lenght Polymorphism)

* **مواد و روشها:** در این بررسی، بر اساس سکانس ژن کدکننده آنتی ژن سطحی ۳۰ کیلودالتونی انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار یک جفت پرایمر طراحی شد و با استفاده از روش واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) یک قطعه ۳۷۴ جفت نوکلئوتیدی (bp) از DNA ژنومی تکثیر گردید. برای افتراق این دو گونه آمیب از اختلاف برش آنزیمی محصول PCR با آنزیم HinfI و مقایسه آن با ایزوله‌های استاندارد استفاده شد.

* **یافته‌ها:** الگوی RFLP ایزوله‌های استاندارد انتامبا هیستولیتیکا دو باند ۲۱۹ bp و ۱۵۵ bp و در انتامبا دیسپار ۳ باند ۱۵۵bp و ۱۵۲bp و ۶۷bp را نشان داد. با انجام این روش بر روی ۸ ایزوله جدا شده در تهران همگی الگوی انتامبا دیسپار (۳ باند ۱۵۵bp و ۱۵۲bp و ۶۷bp) را نشان دادند.

* **نتیجه‌گیری:** تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار از لحاظ بالینی و اپیدمیولوژی دارای اهمیت زیادی می‌باشند. این دو آمیب از نظر مرفولوژی غیر قابل افتراق هستند اما روشهای مبتنی بر PCR می‌توانند برای تشخیص دقیق این دو آمیب مورد استفاده قرار گیرند.

گل واژگان: PCR-RFLP، انتامبا هیستولیتیکا، انتامبا دیسپار، تشخیص افتراقی

مقدمه

انتامبا هیستولیتیکا تک یاخته بالقوه بیماریزای انسان می‌باشد. این آمیب در قسمتهای انتهایی روده بزرگ مستقر می‌شود و سالانه ۵۰۰ میلیون نفر را در جهان آلوده می‌سازد (۱). اکثر مواردآلودگی به این تک یاخته بدون علائم بالینی بوده ولی تقریباً در ۱۰ درصد افراد آلوده تهاجم این آمیب به بافتهای روده و خارج روده سبب ایجاد بیماریهایی نظیر اسهال خونی، آبسه آمیبی کبد، آبسه آمیبی ریه و سایر اعضاء بدن و حتی مرگ افراد مبتلا می‌شود. آمیباز با ایجاد بیش از ۱۰۰ هزار مورد مرگ و میر سالانه در جهان،پس از مالاریا دومین بیماری تک یاخته‌ای کشنده انسان می‌باشد (۲).

مطالعات و تحقیقات بیوشیمیایی، ایمنولوژیکی و ژنتیکی که در سالهای اخیر روی آمیبهای جدا شده از افراد فاقد علائم (حاملین سالم) و مبتلایان با علائم بالینی صورت گرفته ثابت کرده که آنچه قبلاً به عنوان انتامبا هیستولیتیکا نامیده می‌شد در واقع متشکل از دوگونه تک یاخته است که از نظر رفتار بیولوژیکی و بیماریزایی کاملاً متفاوتند (۳). یکی از این دوگونه بالقوه پاتوژن بوده و قادر به ایجاد بیماری می‌باشد و اما گونه دیگر غیر بیماریزا بوده و هیچگاه نمی‌تواند به بافتهای بدن تهاجم کرده و ایجاد بیماری کند. جمع آوری این اطلاعات و شواهد باعث شد که در سال ۱۹۹۳ تعریف مجددی از انتامبا هیستولیتیکا صورت گیرد و وجود دوگونه آمیب رسماً پذیرفته شود. گونه بالقوه بیماریزا انتامبا هیستولیتیکا و گونه غیر بیماریزا انتامبا دیسپار نامیده شد (۴).

افتراق انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار از لحاظ بالینی بسیار حائز اهمیت است. انتامبا دیسپار یک آمیب همسفره روده انسان بوده و هیچگونه بیماریزایی ندارد و لذا احتیاج به درمان هم ندارد در حالی که آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا اگر درمان نشود ممکن است منجر به بیماریهای شدید و حتی مرگ بیمار شود.

به جز در موارد دیسانتری شدید که مشاهده گلبولهای قرمز در سیتوپلاسم آمیبهای هماتوفاژ نشانگر ابتلای فرد به انتامبا هیستولیتیکا می‌باشد، در سایر موارد با میکروسکوپ نوری نمی‌توان تروفوزئیت یا کیست این دو آمیب را از یکدیگر متمایز نمود.

امروزه افتراق این دو آمیب با استفاده از تکنیکهای پیچیده و گران قیمت نظیر مقایسه الگوی حرکت الکتروفورزی ایزوآنزیمها (۵)، استفاده از آنتی بادیهای مونوکلنال (۶، ۷)، استفاده از پروبهای نشاندار DNA (۸)، و نیز برشهای مبتنی بر PCR (۹) صورت می‌گیرد. در بررسی الگوی حرکت الکتروفورزی ایزوآنزیمهای این دو آمیب حداقل دو ایزوآنزیم مختلف با هم مقایسه میگردند که الگوی حرکت الکتروفورزی آنها در انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار با هم تفاوت دارد (۵). آنتی بادیهای مونوکلونال ساخته شده برای اپی توپهای خاص از انتامبا هیستولیتیکا قادر به شناسایی این آمیب از سایر تک یاخته‌ها می‌باشد. همچنین با استفاده از روشهای DNA Prob و PCR می‌توان تفاوتهای این دو آمیب را در سطح ژنوم نشان داد (۸، ۹). مقایسه ترادف DNA ژنومی انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار حداقل ۵ درصد تفاوت را نشان داده است (۴). از این اختلاف می‌توان به خوبی در متمایز کرده این دو آمیب از همدیگر استفاده کرد. هدف از این تحقیق تعیین اختلاف احتمالی الگوی برش آنزیمی این دوگونه بر روی یک قطعه تکثیر شده از ژن کد کننده آنتی ژن سطحی ۳۰ KD انتامباهیستولیتیکا/انتامبا دیسپار و استفاده از آن در تشخیص دو آمیب (ایزوله‌های تهران) از یکدیگر بوده است.

مواد وروشها

در این بررسی به علت در دسترس نبودن سویه انتامبا هیستولیتیکای ایران از سویه‌های بین‌المللی انتامبا هیستولیتیکا شامل سویه‌های HK9 و 200-NIH که در محیط کشت اگزنیک TYI-s-33 رشد و تکثیر یافته بودند و نیز سویه‌های انتامبا دیسپار شامل سویه‌های ایرانی AS2IR و AS16IR تعیین هویت شده با روش بررسی الگوی حرکت الکتروفورزی ایزوآنزیمها (I= زایموگرام) و تکثیر یافته در محیط کشت YIGADHA-S، به عنوان استاندارد استفاده شد (۱۰).

* نمونه‌گیری

مدفوع افراد آلوده مراجعه کننده به آزمایشگاههای تشخیص طبی در شهر تهران جمع آوری شد و در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۸ ایزوله که از افراد دفع کننده کیست جدا سازی شده بود در محیط کشت رابینسون (۱۱) تکثیر داده شد و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

* استخراج DNA

پس از رشد انبوه انگل، با استفاده از سانتریفوژ ترفوزئیتها از محتویات محیط کشت جدا سازی و سه نوبت با بافر PBS (PH=7.2) شستشو داده شدند. DNA با روش فنل/کلروفورم طبق متد Sambrook و همکاران (۱۲) استخراج گردید. حدود ۲ میلیون تروفوزوئیت انگل در ۲۰۰ میکرولیتر محلول STE(100mM Ncacl, 10mMTris, 1mM EDTA) سوسپانسیون شد و ۲ درصد SDS (w/v) و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (20mg/ml) به آن افزوده شد. سوسپانسیون فوق ۳ ساعت در بن ماری °۶۰ سانتیگراد قرار گرفت و سپس ۱۰ دقیقه جوشانده شد. یک دفعه با محلول فنل/کلروفورم استخراج گردید و سپس با الکل ایزوپروپیلیک مطلق رسوب داده شد. پس از شستشوی نمکهای آن با الکل °۷۰ سانتیگراد، DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید و تا هنگام انجام PCR در °۲۰- سانتیگراد نگهداری شد.

* طراحی پرایمر

دو الیگونوکلئوتید HF(aag aaa ttg ata tta atg aat ata) و HR(atc ttc caa ttc cat cat cat) بر اساس ترادف ژن کد کننده آنتی ژن سطحی ۳۰ کیلودالتونی انتامبا هیستولیتیکا (accession number=U67154) و انتامبا دیسپار (accession number=AB026184) با استفاده از نرم‌افزار DNAsis طراحی و سنتز گردید. برای بررسی اختصاصی بودن پرایمرها و بررسی واکنش متقاطع آن با سایر ترادفهای موجود در بانک ژن از نرم‌افزار Blast استفاده شد.

* انجام PCR-RFLP

(PCR-RFLP): واکنش PCR در حجم ۳۰ میکرولیتر با دستگاه ترموسیکلر ساخت شرکت اپندورف با شرایط زیر و با استفاده از مواد ساخت شرکت Roche انجام گرفت:

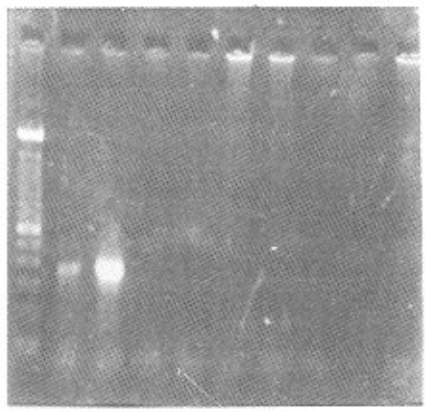
100μM dNTP, 1.5mM MgCl2, 50mMKd, 10mM TrisHCl (pH 8.9 و 20 pmol پرایمر، 0.3U Taq DNA poly و 0.1-1μg DNA. مراحل PCR به این شرح می‌باشد:

دناتوراسیون اولیه	۹۴ درجه سانتیگراد	۳ دقیقه
۳۰ سیکل: شامل		
دناتوراسیون	۹۴° سانتیگراد	۳ ثانیه
آنیلینگ	۵۴° سانتیگراد	۳۰ ثانیه
اکستنشن	۷۲° سانتیگراد	۳۰ ثانیه
در پایان اکستنشن نهایی	۷۲° سانتیگراد	۵ دقیقه

جهت بررسی کمیت و کیفیت کار مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه UV Transilluminator با طول موج 254nm مشاهده گردید. برش آنزیمی به مدت ۲ ساعت با آنزیم HinfI در حرارت ۳۷° سانتیگراد انجام گرفت. قطعات حاصل از برش آنزیمی روی ژل پلی آکریل آمید ده درصد کنار یک مارکر (100bp ladder) مقایسه شدند.

یافته‌ها

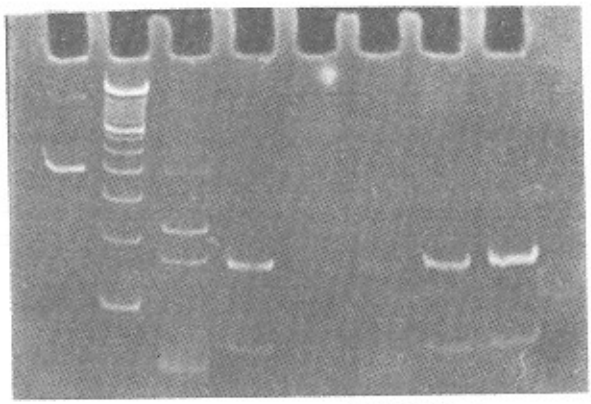
واکنش PCR با DNA استخراج شده از سایر تک یاخته‌های روده‌ای (ژیاردیا لامبلیا، انتامبا کلی، انتامبا هارتمانی، بلاستوسیستیس هومینیس، یدآمبا بوچلی و اندولیماکس نانا) انجام گرفت. انجام الکتروفورز نشان داد که هیچ باندی تشکیل نگردید. از واکنش DNA با PCR سویه‌های استاندارد با پرایمرهای HF و HR یک باند 374bp به دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR تک یاخته‌های روده‌ای روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد

ستون ۱- DNA مارکر، ستون ۲- انتامبا دیسپار، ستون ۳- انتامبا هیستولیتیکا، ستون ۴-۱۰- به ترتیب انتامبا کلی انتامبا هارتمانی - ژیاردیا لامبلیا - بلاستوسیستیس هومینیس - اندولیماکس نانا - کنترل منفی

آنزیم HinfI روی محصول PCR سویه‌های استاندارد انتامبا هیستولیتیکا دارای یک جایگاه برش (GANTC) در نوکلئوتید ۱۵۵ بود که حاصل برش آن دو قطعه ۲۱۹bp و ۱۵۵bp بود، در حالی که این آنزیم روی محصول PCR سویه‌های استاندارد انتامبا دیسپار دارای دو جایگاه برش (نوکلئوتیدهای ۱۵۵ و ۲۲۲) است که حاصل برش آن سه قطعه ۱۵۵ و ۱۵۲ و ۶۷ جفت نوکلئوتید بود. روی ژل اکریل آمید ده درصد قطعات ۱۵۵ و ۱۵۲ انتامبا دیسپار به صورت یک باند مشاهده شدند (شکل ۲).



شکل ۲: مقایسه الگوی PCR-RFLP انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار بر ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد. ستون ۱- بدون برش آنزیمی، ستون ۲- مارکر، ستون ۳- انتامبا هیستولیتیکا (سویه استاندارد)، ستون ۴- انتامبا دیسپار (سویه استاندارد)، ستون ۵-۸- نمونه‌های تهران

برش آنزیمی محصول PCR با پرایمرهای HF و HR پس از الکتروفورز روی ژل اکریل آمید ۱۰درصد برای انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار دو الگوی کاملاً متفاوت نشان داد که به راحتی از همدیگر قابل افتراق هستند. از این دو الگو برای تعیین هویت ۸ ایزوله جدا شده از افراد دفع کننده کیست انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار در تهران استفاده شد که همگی الگوی انتامبا دیسپار را نشان دادند (شکل ۲).

بحث

تفکیک انتامبا هیستولیتیکا به دوگونه مجزا، بدون شک یکی پیشرفتهای مهم در زمینه تک یاخته‌های روده‌ای در دهه گذشته بوده است. کمیته تخصصی کارشناسان و متخصصان آمیبیاز سازمان جهانی بهداشت در سال ۱۹۹۷ درکشور مکزیک تشکیل گردید و توصیه نمود که مطالعات و تحقیقات آمیبیاز به سوی ایجاد و بهبود تکنیکهای آزمایشگاهی برای تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار سوق داده شوند (۲). این جداسازی و تشخیص افتراقی نه تنها می‌تواند از مصرف بی رویه و غیر ضروری داروهای ضد تک یاخته که گاه دارای عوارض جانبی زیادی هستند جلوگیری کند بلکه می‌تواند تغییرات عمده در زمینه‌های اپیدمیولوژی و اکولوژی انتامبا هیستولیتیکا ایجاد نماید.

تاکنون روشهای متعددی برای جداسازی و افتراق این دو تک یاخته به کار گرفته شده است از جمله مقایسه الگوی حرکت الکتروفورزی ایزوآنزیمها، جداسازی آنتی ژنهای اختصاصی با استفاده

از آنتی‌بادیهای مونوکلنال، روشهای مبتنی PCR و نیز استفاده از پروبهای نشان دار DNA. این روش اگر چه روشهایی حساس و اختصاصی هستند ولی به علت هزینه زیاد و پیچیده بودن نمی‌توانند به عنوان روش روتین در آزمایشگاههای تشخیص طبی در کشورهای در حال توسعه مورد استفاده قرار گیرند اما این روشها می‌توانند مقدمه‌ای باشند برای ایجاد یک روش سریع و ارزان قیمت که به راحتی بتواند در همه آزمایشگاهها به کار گرفته شود.

در سالهای اخیر تعدادی از محققین برای افتراق انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار از آنتی بادیهای مونوکلنال در مقابل زیر واحد ۱۷۰ کیلو دالتونی لکتین اختصاصی چسبنده با گالاکتوز در انتامبا هیستولیتیکا استفاده کرده‌اند. این روش تنها قادر به شناسایی اختصاصی آنتی ژنهای انتامبا هیستولیتیکا می‌باشد و آنتی بادیها مونوکلنال اختصاصی برای انتامبا دیسپار تهیه نشده است (۱۴). به نظر می‌رسد استفاده از این روش تنها برای کشورهایی مناسب است که میزان بالایی از آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا در آنجا مشاهده می‌شود و این انگل اندمیک آن مناطق می‌باشد. روش PCR-RFLP مورد استفاده در مطالعه حاضر علاوه بر اینکه توانست دو گونه انتامبا را از همدیگر افتراق دهد با سایر تک یاخته‌های روده‌ای نیز واکنش متقاطع نشان نداد لذا روشی بسیار اختصاصی است. با انجام این روش روی سویه‌های استاندارد انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار با زایمودم مشخص و نیز مقایسه نتایج این روش روی ۸ ایزوله تعیین هویت شده با روش بررسی الگوی حرکت الکتروفورزی ایزوآنزیمها نشان می‌دهد که نتایج الگوی الکتروفورزی ایزوآنزیمها و PCR-RFLP کاملاً همخوانی دارند.

محققین ژاپنی برای افتراق انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار از دو جفت پرایمر اختصاصی استفاده کرده‌اند که یک جفت از آنها اختصاصی انتامبا هیستولیتیکا بوده و یک قطعه ۱۰۰ جفت نوکلئوتیدی را تکثیر می‌کند، جفت پرایمر دیگر یک قطعه ۱۰۱ جفت نوکلئوتیدی از DNA انتامبا دیسپار را تکثیر می‌کند (۱۵). از آنجاییکه توالی دو جفت پرایمر فوق بسیار شبیه هم می‌باشد و فقط چند نوکلئوتید تفاوت دارند لذا احتمال واکنش متقاطع انتامبا هیستولیتیکا با پرایمرهای انتامبا دیسپار و بالعکس وجود دارد و از طرف دیگر در این روش احتیاج به دو بار انجام PCR بر روی یک نمونه نامعلوم می‌باشد. در روش PCR-RFLP، استفاده از برش آنزیمی تفاوت واضح و چشمگیری بین الگوی حرکت الکتروفورزی محصول PCR دو آمیب نشان می‌دهد. همچنین وجود یا عدم وجود قطعه ۶۷ جفت نوکلئوتیدی می‌تواند شاخص مناسبی باشد برای تشخیص نمونه‌هایی که به طور همزمان آلوده به مخلوط انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار می‌باشد. در این روش انجام تنها یک مرحله PCR برای شناسایی نمونه‌های نامعلوم کفایت می‌کند. روش مورد بحث در یک روز قابل اجرا است و از هیچ گونه مواد رادیواکتیو نیز استفاده نمی‌شود.

روشهای مبتنی بر PCR بسیار دقیق می‌باشند و می‌توانند تا زمان پیدایش روشهای ساده‌تر به عنوان یک ابزار تشخیصی دقیق مورد استفاده قرار گیرند. با وجودی که استفاده از این روش مستقیماً برای کیست آمیب نیز مناسب است اما به تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز می‌باشد. سازمان جهانی بهداشت توصیه می‌کند به منظور روشن شدن وضعیت اپیدمیولوژیک این دو آمیب در سطح جهان مطالعات میزان شیوع بر مبنای افتراق این دو گونه از همدیگر انجام پذیرد (۲). به نظر می‌رسد استفاده از روش PCR-RFLP در راه رسیدن به این هدف مفید و کار آمد باشد.

References

1. Jackson TF, Ravdin JI: Differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar infection. Parasitol Today 1996; 12(10): 406-409

2. World health organization: Entamoeba taxonomy. Bull WHO 1997; 75(3): 291-292

3. Clark CG: Entamoeba dispar,an organism reborn. Rans R Soc Trop Med Hyg 1998; 92: 361-364

4. Diamond LS, Clark CG: A redescription of Entamoeba histolytica, Schaudin 1903, (Emended Walker, 1911) separating it from Entamoeba dispar, Brumpt 1925. J Euk Microbiol 1993; 40(3): 340-344

5. Sargeaunt PG, Williams JE, Grene JD: The differentiation of invasive and non invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978; 72: 519-521

6. Haque R, Neville LM, Wood S, Petri WA Jr: Detection of E.histolytica and E.dispar directly in stool. Am J Trop Med Hyg 1994; 50(5): 595-596

7. Petri WAJr, Haque R, Leyerly D, Vines RR: Estimation the impact of amoebiasis on health. Parasitology Today 2000; 16(8): 320-321

8. Bracha R, Diamond LS, Ackers JP, Burchard GD, Mirelman D: Differentiation of clinical isolate of Entamoeba histolytica by using specific DNA probes. J Clin Microbiol 1990; 28: 680-684

9. Tannich E, Burchard GD: Differentiation of pathogenic from non-pathogenic Entamoeba histolytica by restriction fragment analysis of a single gen amplified invitro. J Clin Microbiol 1991; 29(2): 250-252

۱۰. حقیقی علی: کشت آگزنیک انتامبا هیستولیتیکا و تهیه آنتی ژن پیکره‌ای و محلول برای روشهای IFA و الیزا در تشخیص سرولوژی آمیبیازیس. پایان نامه دکتری انگل‌شناسی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران ۷۸-۱۳۷۷

11. Robinson GL: The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. Trans R Soc Trop Med Hyg 1968; 62(2): 285-294

12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular coloning: A laboratory manual (2 ed). Cold Spring Habor Laboratory press, Cold Spring Habor NY 1989 pp E.3-E.4

13.Tachibana H, Ihara S, Kobayashi S, Kaneda Y, Takuchi T, Watanabe Y: Differentiation in genomic DNA sequences between pathogenic and non-pathogenic isolate of Entamoeba histolytica identified by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29(10): 2234-2239

14. Abd-Alla WD, Jackson TF, Gathiram V, El-HauyAM, Ravdin JI: Differentiation of pathogenic Entamoeba histolytica infections from non-pathogenic infections by detection of galactose-inhibitable adherance protein antigen in sera and faeces. J Clin Microbiol 1993; 31: 2845-2850

15. Tachibana H, Kobayashi S, Takekoshi M, Ihara, S: Distinguishing pathogenic isolates of Entamoeba histolytica by polymerase chain reaction. J Inf Dis 1991; 164: 825-826