تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار با روش PCR

سیما راستی [۱*]، علی حقیقی [۲]، مهرنوش حاتمی [۳]

خلاصه

سابقه و هدف: انتامبا هیستولیتیکا تک‌یاخته بیماری‌زای دستگاه گوارش است که طیف وسیعی از علایم بالینی نظیر اسهال خونی تا آبسه آمیبی ایجاد می‌کند و از نظر شکل ظاهری نمی‌توان آن را از آمیب غیر بیماری‌زای انتامبا دیسپار متمایز نمود. به همین منظور تحقیقی جهت شناسایی و تشخیص افتراقی این دو آمیب با روش PCR صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ٤٥٠ نمونه مدفوع از مراجعین به آزمایشگاه بیمارستان طالقانی با روش مستقیم و فرمول دترژانت آزمایش شد که جمعاً ۵ مورد انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار گزارش گردید و نمونه مدفوع آنها به آزمایشگاه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ارسال گردید. پس از کشت در محیط رابینسون و استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با دو جفت پرایمر اختصاصی گونه از ژن لوکوس ۲-۱ انجام گرفت و گونه آمیب شناسایی گردید.

نتایج: آلودگی انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار با روش مستقیم و فرمول دترژانت ۱/۱ درصد گزارش شده بود. واکنش PCR با پرایمر فوق در ٤ مورد از ۵ نمونه مورد مطالعه، قطعه حدود ٤۳۰ جفت باز را تکثیر نمود و انتامبا دیسپار شناسایی گردید. بـا روش PCR هر چهار ایزوله مورد بررسی انتامبا دیسپار گزارش گردید. یکی از نمونه‌ها کشت نشد و از مطالعه حذف شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به لزوم تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار از لحاظ بالینی و اپیدمیولوژی استفاده از روش PCR جهت شناسایی و تشخیص دقیق این دو آمیب مفید می‌باشد.

واژگان کلیدی: انتامبا هیستولیتیکا، انتامبا دیسپار، تشخیص افتراقی، PCR

۱- استادیار گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۲- دانشیار گروه انگل‌شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- کارشناس ارشد گروه انگل‌شناسی آزمایشگاه بیمارستان طالقانی

تاریخ دریافت: ۸٤/۸/۲۲

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۵/۳/۱۳

* نویسنده مسوول: سیما راستی

آدرس: کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

پست الکترونیک: Rasti_S@kaums.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۳ ۲٦۱ ۱٥٦۸

فاکس: ۰۳٦۱ ٥٥٥۸۸۸۳

مقدمه

آمیبیازیس یکی از بیماریهای مهم انگلی است که در اثر انتامبا هیستولیتیکا در انسان به وجود می‌آید. مطالعات بیوشیمیایی، ژنتیکی و ایمنولوژیکی ثابت کرده، ارگانیسمی که قبلاً تحت عنوان انتامبا هیستولیتیکا شناخته می‌شد، در واقع متشکل از دو ارگانیسم است که از نظر مرفولوژی کاملاً شبیه هم هستند ولی از نظر رفتار بیولوژیکی و بیماری‌زایی با هم تفاوت دارند، یک گونه به نام انتامبا هیستولیتیکا پاتوژن بالقوه و مهاجم و بیماری‌زا است و باعث کولیت آمیبی و انواع آمیبیازیس خارج روده‌ای می‌شود و البته در برخی موارد بدون علایم بالینی می باشد. گونه دیگر که انتامبا دیسپار نامیده می‌شود به طور همزیست در روده زندگی می‌کند و غیرمهاجم و غیر بیماری‌زا است و هیچ علایم بالینی ایجاد نمی‌کند [۱، ۲، ۳، ٤، ۵، ٦]. سازمان جهانی بهداشت توصیه می‌کند تحقیقات به سوی ایجاد و بهبود تکنیک‌های آزمایشگاهی برای تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار سوق داده شود [۳]. بر اساس مطالعه هوشیار در سال ۱۳۸۰ مبنی بر شناسایی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار با PCR در ایران، ۹۲/۷٪ موارد انتامبا دیسپار و ۷/۳ درصد را انتامبا هیستولیتیکا یا آلودگی توأم به هر دو گونه تشکیل می‌دهد [۷]. امروزه افتراق این دو آمیب با استفاده از تکنیک‌های پیچیده و گران‌قیمت نظیر مقایسه الگوی حرکت الکتروفورزی ایزوآنزیم‌ها، استفاده از پروب‌های نشان‌دار DNA آنتی‌بادی‌های تک دودمانی ساخته شده برای اپی‌توپ‌های

خاص نظیر لکتین گالاکتوز ان استیل گالاکتوز امین (TechLab E. histolytica II Kit cat. No T5017) و PCR انجام می‌گیرد [۸، ۹، ۱۰]. ۲/۲٪ تا ۱۷٪ تفاوت در سکانس نوکلئوتید ژن‌های مختلف انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار مشاهده گردیده است [۱۱]. دقت PCR برای تشخیص انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار ۱۰۰٪ می‌باشد [۹]. از آنجایی که از نظر مرفولوژیکی این دو آمیب مشابه بوده و با روش میکروسکوپی نمی‌توان این دو گونه را از یکدیگر متمایز نمود، این تحقیق جهت تشخیص افتراقی آنها با روش PCR صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه و نگهداری: در این مطالعه ٤٥٠ نمونه مدفوع از مراجعین به آزمایشگاه بیمارستان طالقانی تهران از اسفند ۱۳۸۳ لغایت تیرماه ۱۳۸٤ با روش مستقیم و فرمول دترژانت آزمایش شدند. جمعاً ۵ مورد انتامبا هستولیتیکا/انتامبا دیسپار گزارش گردید. نمونه‌های مدفوع بلافاصله به آزمایشگاه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ارسال گردید و در محیط کشت سرم منعقده و رابینسون [۱۲] کشت داده شدند و ترفوزوئیت‌های تکثیر یافته در ازت مایع کرایو گردیدند. از سویه استاندارد انتامبا هیستولیتیکا (HM1- IMSS) که در سال ۱۹۵۹ در مکزیک جدا شده بود از کشور ژاپن به ایران منتقل گردید و در محیط TYI - S - 33 پاساژ یافت [۱۳، ١٤] و به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و سویه انتامبا دیسپار (AS 16 IR) که در سال ۱۳۷۷ در ایران جدا شد در محیط رابینسون نگهداری گردید [۱۵] و به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

استخراج DNA از انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار: پس از افزایش تعداد ترفوزوئیت‌های آمیب در محیط کشت رابینسون به میزان حدود ٤٠٠٠٠ ترفوزوئیت، آن را سانتریفوژ کرده و DNA استخراج گردید [١٦، ۱۷]. بدین منظور به ۳۰۰ µl رسوب انگل، ۵۰۰µl بافر لیز و ۵۰µl ۱۰٪ SDS و ۲µl پروتئیناز K افزوده و پس از مخلوط کردن در ۵۵°C به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. جهت غیرفعال کردن آنزیم پروتئیناز K، نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۸۰°C گذاشته شد. جهت حذف پروتئین‌های موجود در محلول، هم حجم آن فنل (۷۰۰µl) اضافه شد. پس از ورتکس و مخلوط کردن نمونه، به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی به ایزوله تمیز دیگری منتقل شد. (پروتئین‌های دناتوره در لایه میانی قرار می‌گیرند) سپس هم حجم آن کلروفرم (۵۰۰µl) اضافه و سانتریفوژ شد. مایع رویی به ایزوله دیگری منتقل شد و بدین ترتیب فنل حذف گردید. برای تغلیظ DNA، ۰/۱ حجم مایع، استات سدیم و دو برابر حجم کل الکل مطلق اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید و مایع رویی خارج گردید. جهت شستشوی DNA، ۱۰۰µl الکل ۷۰٪ به رسوب اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید و به رسوب ۵۰µl آب مقطر غیر یونیزه استریل اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا DNA به صورت کامل حل گردد.

PCR تشخیصی: گونه انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با دو جفت پرایمر اختصاصی گونه از ژن لوکوس ۲-۱ با نام DSP_1+ DSP_2 و HSP_1+HSP_2 (جدول شماره ۱) شناسایی گردیدند [١٤، ١٨].

Table1: Oligonucleotide primers

Primer name	primer sequence 5` to 3`
HSP1 (forward)	GAGTTCTCTTTTTATACTTTTATATGTT
HSP2 (Reverse)	ATTAACAATAAAGAGGGAGGT
DSP1 (Forward)	TTGAAGAGTTCACTTTTTATACTATA
DSP2 (Reverse)	TAACAATAAAGGGGAGGG

PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری با افزودن Pmo1 ۲۰ پرایمرها، ۱/۵mM Mgcl2, ۰/۲ mM dNTP (مخلوط دزاکسی نوکلئوزید تری فسفات) و ۰/۳µ Taq DNA Polymerase (شرکت سیناژن) و ۱µl DNA نمونه انگل (الگو) انجام گرفت. PCR با توموسیکلر Tougch gene با برنامه ذیل در ۳۵ سیکل صورت گرفت: دناتوراسیون در ۹٤°C به مدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ در ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن در ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه. محصول PCR متعاقب الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید و با دستگاه UV Transiluminator مشاهده گردید.

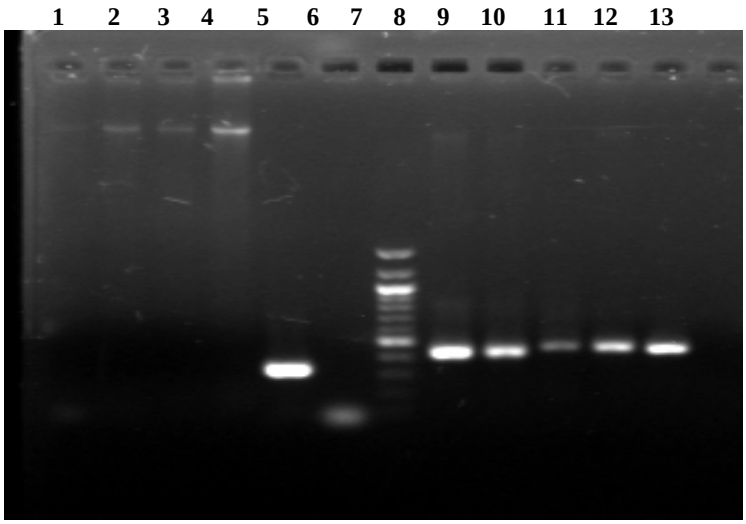
نتایج

از ٤٥٠ نمونه مورد بررسی در آزمایشگاه بیمارستان طالقانی با روش مستقیم و فرمول دترژانت ٦٤ مورد (١٤/٢٪) آلوده به انگل‌های روده‌ای بودند. میزان آلودگی به تک‌یاخته و کرم‌های روده‌ای عبارتند از: ژیاردیا لامبلیا ١٤ مورد (٣/١٪)، انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار ۵ مورد (١/١٪)، انتامبا کلی ۲۰ مورد (٤/٤ ٪)، بلاستوسیستیس هومی نیس ۱۷ مورد (۳/۸٪)،

اندولیماکس نانا ۳ مورد (۰/۷٪)، یدآمبا بوتچلی ۲ مورد (۰/٤٪)، کیلوماستیکس مسنلی ۱ مورد (۰/۲٪)، تریکوموناس هومی نیس ۲ مورد (۰/٤٪)، اسکاریس لومبریکوئیدس ۲ مورد (۰/٤٪)، استرنژیلوئیدس استرکورالیس ۱ مورد (۰/۲٪)، هیمنولیپیس نانا ۷ مورد (۱/٦٪)، تریکوریس تریکورا ۱ مورد (۰/۲٪)، تنیا ۱ مورد (۰/۲٪). جمعاً ۵ مورد (۱/۱٪) انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار گزارش گردید که در محیط رابینسون کشت گردید. ٤ ایزوله پس از ۳ بار پاساژ ترفوزوئت‌های آمیب تکثیر یافت و پس از رسوب‌گیری DNA استخراج گردید. یک نمونه به دلیل عدم موفقیت در کشت از مطالعه حذف گردید. جهت حذف بلاستوسیستیس هومینیس که مانع رشد آمیب در محیط کشت می‌گردد از روش انکوباسیون با آب مقطر استفاده شد. [۱۹] واکنش PCR با DNA استخراجی از ٤ ایزوله انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار با پرایمرهای اختصاصی انتامبا هیستولیتیکا (HSP1+HSP2) و انتامبا دیسپار (DSP1+DSP2) یک قطعه حدود ٤۳۰ جفت باز را تکثیر نمود و پس از الکتروفورز باند آنها مشابه کنترل مثبت انتامبا دیسپار AS 16 IR مشاهده گردید و چون قطعه مورد نظر با پرایمرهای اختصاصی انتامبا هیستولیتیکا تکثیر نشدند ٤ ایزوله مورد بررسی به عنوان انتامبا دیسپار شناسایی شدند. (تصویر شماره ۱) کنترل مثبت انتامبا هیستولیتیکا (HM1-IMSS) با پرایمرهای اختصاصی (HSP1+HSP2) باند حدود ۳٤۰ جفت باز را نشان داد [۱۸]. (جدول شماره ۱)

جدول ۱- بررسی نتایج آزمایش مدفوع با روش‌های میکروسکوپی، کشت و PCR در مراجعین به آزمایشگاه طالقانی ۱۳۸٤ ـ ۱۳۸۳

میکروسکوپی		کشت		PCR	
انتاماهیستولیتیکا انتامبا دیسپار		انتاماهیستولیتیکا انتامبا دیسپار		گونه انتامبا	تعداد (درصد)
مثبت	۵(۱/۱)	مثبت	٤(۸۰)	انتامبا دیسپار	٤ (۱۰۰٪)
				انتامبا هیستولیتیکا	_
				جمع	٤ (۱۰۰٪)
		منفی	۱(۲۰)		
		جمع	۵(۱۰۰)		
منفی	٤٤۵(۹۸/۹)				
جمع	٤۵۰(۱۰۰)				



تصویر ۱- الکتروفورز محصول PCR ایزوله‌های ایرانی انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبادیسپار روی ژل اگارز ۱/۵٪ ستون ٤-۱: ایزوله‌های انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار با پرایمرهای HSP1+HSP2

ستون۵: کنترل مثبت انتامبا هیستولیتیکا (HM1: IMSS)، ستون ٦: کنترل منفی (D.W)، ستون ۷: مارکر ۱۰۰جفت باز، ستون ۱۱-۸: ایزوله‌های انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار با پرایمرDSP1+DSP2، ستون ۱۲: کنترل مثبت انتامبا دیسپار (AS 16 IR)، ستون ۱۳: کنترل منفی (D.W)

بحث

در این تحقیق، پرایمرهای اختصاصی تعیین گونه انتامبا دیسپار (DSP1 و DSP2) از روی DNA چهار ایزوله انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار، قطعه حدود bp ٤٣٠ تکثیر گردید و همگی الگوی انتامبا دیسپار را نشان دادند. بر اساس نتایج مطالعهٔ هوشیار در ایران در سال ۱۳۸۱ در زمینه تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار (ایزوله‌های تهران) با روش PCR-RFLP هشت ایزوله مورد بررسی، همگی الگوی انتامبا دیسپار را نشان دادند [۲۰]. در بررسی سلیمی در زاهدان در سال ۱۳۸٤ از ۱۵٦۲ نمونه مورد بررسی، DNA هفت نمونه استخراج شد و در ٦ مورد با PCR و پرایمرهای فوق، همگی انتامبا دیسپار شناسایی شدند [۲۱]. نتایج این دو تحقیق با بررسی حاضر مطابقت دارد. نتایج مطالعات در ژاپن در سال ۲۰۰۰، فون غالب حاملین بدون علایم بالینی را انتامبا هیستولیتیکا ولی در هلند فون غالب را انتامبا دیسپار گزارش نموده است [۲۲، ۲۳]. بر اساس نتایج مطالعات Clark در سال ۱۹۹۸ حتی در نقاط شیوع آمیبیازیس مهاجم، انتامبا دیسپار گونه غالب است و نسبت شیوع ۱۰ به ۱ است و تخمین می‌زنند. ۹۰٪ عفونت‌ها به دلیل انتامبا دیسپار است [٦]. با PCR در لوکوس ۲-۱ بین سویه‌های انتامبا دیسپار مورد بررسی از نظر اندازه تفاوت مشاهده گردید. در تحقیق حقیقی و همکاران در سال ۲۰۰۲ پلی‌مورفیسم قابل توجهی از نظر اندازه، نوع و تعداد واحدها تکرارشونده در لوکوس ۲-۱ در ایزوله‌های انتامبا هیستولیتیکا از نواحی مختلف جغرافیایی گزارش گردیده است [۱٤]. نکته جالب اینکه در یکی از نمونه‌ها که اسهالی و حاوی RBC و WBC بود، بر خلاف انتظار با PCR، سویه انتامبا دیسپـــار شناسـایی شد. بلع RBC توسط انتامبا دیسپار گزارش شده است [۹]. بر اساس پیشنهاد سازمان جهانی بهداشت درمان دارویی در موارد آلودگی به انتامبا دیسپار توصیه نمی‌شود [۳، ٦] و فقط در موارد عفونت قطعی انتامبا هیستولیتیکا توصیه می‌شود، لذا استفاده از روش‌های ملکولی جهت تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار و تشخیص دقیق بیماری و درمان دارویی جهت جلوگیری از مصرف بی‌رویه و غیرضروری داروهای ضد تک‌یاخته و بروز مقاومت دارویی الزامی است [۲، ۳، ٦]. در سال‌های اخیر کاربرد موفقیت‌آمیز PCR برای تشخیص افتراقی همزمان انتامبا هیستولیتیکا از انتامبادیسپار در مطالعات متعدد گزارش شده است [۲٤]

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیقات نشان داده است جهت شناسایی و افتراق انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار PCR حساس‌تر و اختصاصی‌تر از کیت جستجوی آنتی‌ژن با روش ELISA است [۲۵]. از Multiplex PCR با استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی در یک واکنش برای شناسایی دو گونه آمیب در نمونه مدفوع استفاده شد. با این روش عفونت همزمان انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار در بچه‌های مکزیکی ۲٤/۵٪ گزارش گردید [۲٦]. لذا از روش PCR می‌توان تا زمان پیدایش روش‌های ساده‌تر به عنوان یک ابزار تشخیص دقیق افتراق انتامبا هیستولیتیکا از انتامبادیسپار استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از جناب آقای دکتر بهرام کاظمی و سرکار خانم مژگان بنده‌پور در مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر همکاری صمیمانه و صادقانه در مطالعه تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند و از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر حمایت‌های مالی و خانم مریم حیدری منشی گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی تشکر می‌گردد.

References:

1- Stanley SL Jr. Amoebiasis. ***Lancet*** 2003; 361: 1025-1034.
2- Ravdin JI. Entamoeba histolytica amebiasis. In: Mandell, Douglas & Bennet, s: Principle & Practice of infectious Diseases. 5 th ed. Churchill Livingston: New York: 2000. p. 2798-2805.
3- WHO/PAHO/UNESCO Report. A consultation with experts on Amoebiasis Mexico City, Mexico. ***Epidemiological Bulletin*** 1997; 181: 13-14.
4- Martinez-Palomo A. Espinosal-Cantellano E. Amoebiasis In: Topley and Wilson: Microbiology and Microbial Infectious. 9 th ed. Arnold: 1998.
5- Jachson TF. Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. ***Int j parasitol*** 1998; 28: 181-186.
6- Clark CG. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene meeting at Manson House, London, 19 February 1998. Amoebic disease. Entamoeba dispar, an organism reborn. ***Trasn R Soc Trop Med Hyg*** 1998; 92: 361-364.

۷- هوشیار حسین، شناسایی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار با استفاده از PCR و تعیین پراکندگی آن در سه منطقه آب و هوایی ایران. پایان‌نامه Ph.D انگل‌شناسی تهران: دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۸۱-۱۳۸۰.

8- Martinez-Palomo A. Espinosa-Cantellano M. Amoebiasis: New Understanding and New Goals. ***parasitology today*** 1998; 14: 1-3.

9- Tanyuksel M. Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. ***Clin Microbiol Rev*** 2003; 164: 713-729.

10- Myung K. Burch D. Jackson TF. Stanley SL Jr. Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant Entamoeba histolytica antigen-based ELISA. ***Arch Med Res*** 1992; 23: 285-288.

11- Gonzalez-Ruiz A.Wright SG. Disparate amoebae. ***lancet*** 1998; 351: 1672-1673.

12- Robinson GL. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. ***Trans R Soc Trop Med Hyg*** 1968; 62: 285-294.

13- Diamond LS. Harlow DR. Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba.. ***Trans R Soc Trop Med Hyg*** 1978; 72: 431-432.

14- Haghighi A. Kobayashi S. Takeuchi T. Masuda G. Nozaki T. Remarkable genetic polymorphism among Entamoeba histolytica isolates from a limited geographic area. ***J Clin Microbiol*** 2002; 40: 4081-4090.

15- Kobayashi S. Imai E. Haghighi A. Khalifa SA. Tachibana H. Takeuchi T. Axenic cultivation of Entamoeba dispar in newly designed yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium. ***J Parasitol*** 2005; 91: 1- 4.

16- Sambrook J. Fritsch F. Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual. 3th ed. Cold Spring Harbor laboratory Press: 2001. p. 6.

17- Mcpherson and Moller SG. PCR. Bios Scientific publisher: 2000. p. 63-64.

18- Zaki M. Meelu P. Sun W. Clark GG. Simultaneous differentiation and typing of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar. ***J Clin Microbiol*** 2002; 40: 1271-1276.

19- Smedley SR. A method of freeing cultures of Entamoeba histolytica from contamintion with Blastocystis. ***Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*** 1956; 50: 232-233.

۲۰ـ هوشیار حسین، رضاییان مصطفی. تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار (ایزوله‌های تهران) با روش یاخته سال چهارم. شماره۱۳:. صفحات ۱۱ تا ۱۵.

۲۱ـ سلیمی خراشاد علیرضا، بررسی میکروسکوپی و افتراق انتامبا هیسولیتیکا از انتامبادیسپار با روش در مراکز درمانی زاهدان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی، تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۱۳۸٤.

22- Tachibana H. Kobayashi S. Nagakura K. Kaneda Y. Takeuchi T. Asymptomatic cyst passers of Entamoeba histolytica but not Entamoeba dispar in institutions for the mentally retarded in Japan. ***Parasitol Int*** 200: 49: 31-35.

23- Verwieg JJ. Blotkamp J. Brienen EA. Aguirre A. Poldevman AM. Differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar cysts using polymerase chain reaction on DNA isolated from faeces with spin columns. ***Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dic*** 2000; 19: 358-361.

24- Evangelopouos AG. Spanakos E. Patsoula N. 2000, A nested, muliplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in feaeces, ***Ann Trop. Med. Parasitol.*** 94: 233-240.

25- Mirelman DY. Nuchamowitz T. Stolarsky. 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: 2405-2407.

26- Nunez YOM. Fernandez D. Torres-Nunez TA. Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of E. histolytica and E. dispar DNA from stool samples. ***Am. J. Trop Med. Hyg*** 2001; 64: 293-297.