

تشخیص افتراقی انتمبا هیستولیتیکا از انتمبا دیسپار با روش PCR

* سیما راستی ، علی حقیقی ^۲ ، مهرنوش حاتمی ^۳

خلاصه

سابقه و هدف: انتمبا هیستولیتیکا تک یاخته بیماری زای دستگاه گوارش است که طیف وسیعی از علایم بالینی نظیر اسهال خونی تا آبse آمیبی ایجاد می کند و از نظر شکل ظاهری نمی توان آن را از آمیب غیر بیماری زای انتمبا دیسپار تمایز نمود. به همین منظور تحقیقی جهت شناسایی و تشخیص افتراقی این دو آمیب با روش PCR صورت گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۴۵۰ نمونه مدفع از مراجعین به آزمایشگاه بیمارستان طالقانی با روش مستقیم و فرمول دترژانت آزمایش شد که جمعاً ۵ مورد انتمبا هیستولیتیکا/انتمبا دیسپار گزارش گردید و نمونه مدفع آنها به آزمایشگاه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ارسال گردید. پس از کشت در محیط راینسون و استخراج DNA، واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) با دو جفت پرایمر اختصاصی گونه از ژن لوکوس ۱-۲ انجام گرفت و گونه آمیب شناسایی گردید.

نتایج: آلدگی انتمبا هیستولیتیکا/انتمبا دیسپار با روش مستقیم و فرمول دترژانت ۱/۱ درصد گزارش شده بود. واکنش PCR با پرایمر فوق در ۴ مورد از ۵ نمونه مورد مطالعه، قطعه حدود ۴۳۰ جفت باز را تکثیر نمود و انتمبا دیسپار شناسایی گردید. با روش PCR هر چهار ایزو له مورد بررسی انتمبا دیسپار گزارش گردید. یکی از نمونه ها کشت نشد و از مطالعه حذف شد.

نتیجه گیری: با توجه به لزوم تشخیص افتراقی انتمبا هیستولیتیکا و انتمبا دیسپار از لحاظ بالینی و ایدمیولوژی استفاده از روش PCR جهت شناسایی و تشخیص دقیق این دو آمیب مفید می باشد.

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

۱- استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پرآپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

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

تاریخ دریافت: ۸۴/۸/۲۲

۳- کارشناس ارشد گروه انگل شناسی آزمایشگاه بیمارستان طالقانی

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۵/۳/۱۳

* نویسنده مسؤول: سیما راستی

آدرس: کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشکده پرآپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

پست الکترونیک: Rasti_S@kaums.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۳ ۲۶۱ ۱۵۶۸

فاکس: ۰۳۶۱ ۵۵۵۸۸۸۳

مقدمه

می کند و غیرمهاجم و غیر بیماری زا است و هیچ علایم بالینی ایجاد نمی کند [۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶]. سازمان جهانی بهداشت توصیه می کند تحقیقات به سوی ایجاد و بهبود تکنیک های آزمایشگاهی برای تشخیص افتراقی انتمبا هیستولیتیکا از انتمبا دیسپار سوق داده شود [۳]. بر اساس مطالعه هوشیار در سال ۱۳۸۰ مبنی بر شناسایی انتمبا هیستولیتیکا از انتمبا دیسپار با PCR در ایران، ۷/۷٪ موارد انتمبا دیسپار و ۷/۳ درصد را انتمبا هیستولیتیکا یا آلدگی توانم به هر دو گونه تشکیل می دهد [۷]. امروزه افتراق این دو آمیب با استفاده از تکنیک های پیچیده و گران قیمت نظیر مقایسه الگوی حرکت الکتروفورزی ایزو آنژریم ها، استفاده از پروب های نشان دار آنتی بادی های تک دودمانی ساخته شده برای ابی توب های DNA

آمیبایزیس یکی از بیماریهای مهم انگلی است که در اثر انتمبا هیستولیتیکا در انسان به وجود می آید. مطالعات بیوشیمیابی، ژنتیکی و ایمنولوژیکی ثابت کرده، ارگانیسمی که قبل از تحت عنوان انتمبا هیستولیتیکا شناخته می شد، در واقع متشكل از دو ارگانیسم است که از نظر مرفو لوژی کاملاً شبیه هم هستند ولی از نظر رفتار بیولوژیکی و بیماری زایی با هم تفاوت دارند، یک گونه به نام انتمبا هیستولیتیکا پاتوزن بالقوه و مهاجم و بیماری زا است و باعث کولیت آمیبی و انواع آمیبایزیس خارج روده ای می شود و البته در برخی موارد بدون علایم بالینی می باشد. گونه دیگر که انتمبا دیسپار نامیده می شود به طور همزیست در روده زندگی

حذف گردید. برای تغليظ DNA، ۰/۱ حجم مایع، استات سدیم و دو برابر حجم کل الكل مطلق اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷ درجه سانتی گراد با دور ۱۲۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و مایع روی خارج گردید. جهت شستشوی DNA 1mL الكل ۱۰۰٪ به رسوب اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۲۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و به رسوب 50 mL آب مقطر غیر یونیزه استریل اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد 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 HSP₁+HSP₂ و DSP₁+DSP₂ و (جدول شماره ۱) شناسایی گردیدند [۱۴، ۱۸].

Table1: Oligonucleotide primers

Primer name	primer sequence 5' to 3'
HSP1 (forward)	GAGTTCTCTTTTATACCTTTATATGTT
HSP2 (Reverse)	ATTAAACAATAAAGAGGGAGGT
DSP1 (Forward)	TTGAAGAGTTCACTTTTATACTATA
DSP2 (Reverse)	TAACAATAAAGGGGAGGG

PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری با افزودن Pmo1 پرایمرها، $1/5\text{mM}$ MgCl₂، $0/2\text{ mM}$ dNTP، $0/3\mu\text{m}$ Taq DNA Polymerase (شرکت سیناژن) و $1\mu\text{L}$ نمونه انگل (الگو) انجام گرفت. PCR با توموسیکلر Tough gene با برنامه ذیل در ۳۵ سیکل صورت گرفت: دناتوراسیون در 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، آنلینگ در 55°C به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن در 72°C به مدت ۹۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در 72°C به مدت ۱۰ دقیقه. محصول PCR متعاقب الکتروفورز روی ژل آگارز $1/5\text{%}$ UV Transiluminator حاوی اتیدیوم بروماید و با دستگاه مشاهده گردید.

نتایج

از ۴۰ نمونه مورد بررسی در آزمایشگاه بیمارستان طالقانی با روش مستقیم و فرمول دتریزانت ۶۴ مورد (۱۴٪)، آنلوده به انگل‌های روده‌ای بودند. میزان آنلودگی به تک‌یاخته و کرم‌های روده‌ای عبارتند از: ژیاردیا لامبیا ۱۴ مورد (۳٪)، انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار ۵ مورد (۱٪)، انتامبا کلی ۲۰ مورد (۴٪)، بلاستوسیستیس هومی نیس ۱۷ مورد (۴٪)،

TechLab می‌گیرد [۸، ۹، ۱۰]. ۱۷٪ تا ۲٪ تفاوت در سکانس نوکلوتید 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 مرفو‌لوزیکی این دو آمیب مشابه بوده و با روش میکرو‌سکوپی نمی‌توان این دو گونه را از یکدیگر تمایز نمود، این تحقیق جهت تشخیص افتراقی آنها با روش PCR صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه و نگهداری: در این مطالعه ۴۰ نمونه مدفوع از مراجعین به آزمایشگاه بیمارستان طالقانی تهران از اسفند ۱۳۸۳ لغایت تیرماه ۱۳۸۴ با روش مستقیم و فرمول دتریزانت آزمایش شدند. جمعاً ۵ مورد انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار گزارش گردید. نمونه‌های مدفوع بلافصله به آزمایشگاه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ارسال گردید و در محیط کشت سرم منعقده و راینسون [۱۲] کشت داده شدند و تروفوژیت‌های تکثیر یافته در ازت مایع کرايو 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 پاساز یافت [۱۳، ۱۴] و به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و سویه انتامبا دیسپار (AS 16 IR) که در سال ۱۳۷۷ در ایران جدا شد در محیط راینسون نگهداری گردید [۱۵] و به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

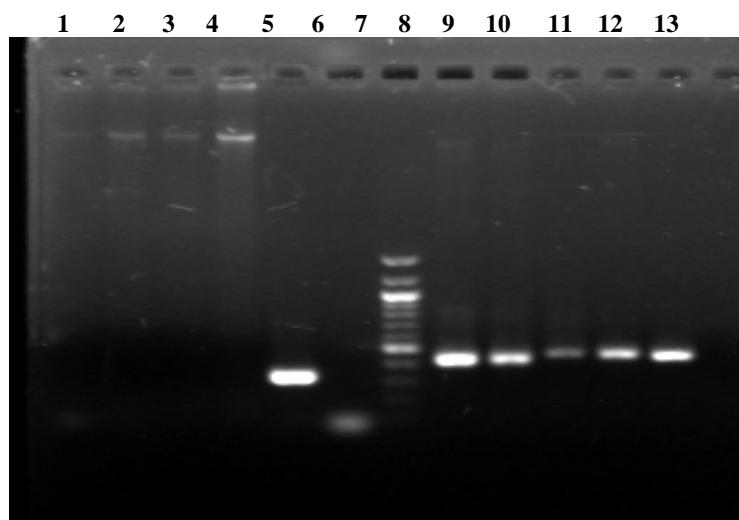
استخراج DNA از انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار: پس از افزایش تعداد تروفوژیت‌های آمیب در محیط کشت راینسون به میزان حدود ۴۰۰۰۰ تروفوژیت، آن را سانتریفوژ کرده و DNA استخراج گردید [۱۶، ۱۷]. بدین منظور به $1\mu\text{L}$ رسوب انگل، $1\mu\text{L}$ بافر لیز و $1\mu\text{L}$ SDS و $1\mu\text{L}$ پروتینیاز K افزوده و پس از مخلوط کردن در 55°C به مدت ۲ ساعت انتکویه گردید. جهت غیرفعال کردن آنزیم پروتینیاز K، نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری 80°C گذاشته شد. جهت حذف پروتین‌های موجود در محلول هم حجم آن فتل ($700\mu\text{L}$) اضافه شد. پس از ورتكس و مخلوط کردن نمونه، به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۲۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی به ایزوله تمیز دیگری منتقل شد. (پروتین‌های دناتوره در لایه میانی قرار می‌گیرند) سپس هم حجم آن کلروفرم ($500\mu\text{L}$) اضافه و سانتریفوژ شد. مایع رویی به ایزوله دیگری منتقل شد و بدین ترتیب فل

می‌گردد از روش انکوپاسیون با آب مقطر استفاده شد. [۱۹] واکنش PCR با DNA استخراجی از ۴ ایزوله انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار با پرایمرهای اختصاصی انتامبا هیستولیتیکا (HSP1+HSP2) و انتامبا دیسپار (DSP1+DSP2) یک قطعه حدود ۴۳۰ 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 ۴ 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 ۳۴۰ جفت باز را نشان داد [۱۸]. (جدول شماره ۱)

اندولیماکس نانا ۳ مورد (۰/۰/۷)، یدآمبا بوتچلی ۲ مورد (۰/۰/۴)، کیلوماستیکس مسلنی ۱ مورد (۰/۰/۲)، تریکوموناس هومی نیس ۲ مورد (۰/۰/۴)، اسکاریس لومبریکوئیدس ۲ مورد (۰/۰/۴)، استرنژیلوئیدس استرکورالیس ۱ مورد (۰/۰/۲)، هیمنولیپس نانا ۷ مورد (۰/۰/۶)، تریکوریس تریکورا ۱ مورد (۰/۰/۲)، تنیا ۱ مورد (۰/۰/۲). جمعاً ۵ مورد (۰/۱/۱) انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار گزارش گردید که در محیط راینسون کشت گردید. ۴ ایزوله پس از ۳ بار پاساز 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

جدول ۱- بررسی نتایج آزمایش مدفع با روش‌های میکروسکوپی، کشت و PCR در مراجعین به آزمایشگاه طالقانی ۱۳۸۴ - ۱۳۸۳

PCR		کشت		میکروسکوپی	
تعداد (درصد)	گونه انتامبا	انتامبا هیستولیتیکا انتامبا دیسپار		انتامبا هیستولیتیکا انتامبا دیسپار	
(۰/۱۰۰) ۴	انتامبا دیسپار	۴(۸۰)	مثبت	۵(۱/۱)	مثبت
—	انتامبا هیستولیتیکا				
(۰/۱۰۰) ۴	جمع				
		۱(۲۰)	منفی		منفی
		۵(۱۰۰)	جمع	۴۴۵(۹۸/۹)	جمع
				۴۵۰(۱۰۰)	



تصویر ۱- الکتروفورز محصول PCR ایزوله‌های ایرانی انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار روی ژل اکاروز ۱/۵٪ ستون ۱-۴: ایزوله‌های انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار با پرایمرهای HSP1+HSP2 ستون ۵: کنترل مثبت انتامبا هیستولیتیکا (HM1: IMSS)، ستون ۶: کنترل منفی (D.W)، ستون ۷: مارکر ۱۰۰ جفت باز، ستون ۸-۱۱: ایزوله‌های انتامبا هیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار با پرایمر DSP1+DSP2. ستون ۲: کنترل مثبت انتامبا دیسپار (AS 16 IR)، ستون ۱۳: کنترل منفی (D.W)

بحث

انتامبا هیستولیتیکا توصیه می شود، لذا استفاده از روش های ملکولی جهت تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار و تشخیص دقیق بیماری و درمان دارویی جهت جلوگیری از مصرف بی رویه و غیر ضروری داروهای ضد تک یاخته و بروز مقاومت دارویی الزامی است [۲، ۳، ۶]. در سال های اخیر کاربرد موفقیت آمیز PCR برای تشخیص افتراقی همزمان انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار در مطالعات متعدد گزارش شده است [۲۴]

نتیجه گیری

نتایج تحقیقات نشان داده است جهت شناسایی و افتراق انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار PCR حساس تر و اختصاصی تر از کیت جستجوی آنتی ژن 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 بچه های مکزیکی ۲۴/۵٪ گزارش گردید [۲۶]. لذا از روش PCR می توان تا زمان پیدایش روش های ساده تر به عنوان یک ابزار تشخیص دقیق افتراق انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از جناب آقای دکتر بهرام کاظمی و سرکار خانم مژگان بنده پور 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 می آورند و از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر حمایت های مالی و خانم مریم حیدری منشی گروه انگل شناسی و فارج شناسی تشکر می گردد.

References:

- Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet* 2003; 361: 1025-1034.
- 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.
- WHO/PAHO/UNESCO Report. A consultation with experts on Amoebiasis Mexico City, Mexico. *Epidemiological Bulletin* 1997; 181: 13-14.
- Martinez-Palomo A. Espinosal-Cantellano E. Amoebiasis In: Topley and Wilson: Microbiology and Microbial Infectious. 9 th ed. Arnold: 1998.
- Jachson TF. Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int j parasitol* 1998; 28: 181-186.
- 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.

در این تحقیق، پرایمرهای اختصاصی تعیین گونه انتامبا دیسپار (DSP1 و DSP2) از روی DNA چهار ایزوبله انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار، قطعه حدود ۴۳۰ bp تکثیر گردید و همگی الگوی انتامبا دیسپار را نشان دادند. بر اساس نتایج مطالعه هوشیار در ایران در سال ۱۳۸۱ در زمینه تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار (ایزوبله های تهران) با روش PCR-RFLP هشت ایزوبله مورد بررسی، همگی الگوی انتامبا دیسپار را نشان دادند [۲۰]. در بررسی سلیمانی در زاهدان در سال ۱۳۸۴ از ۱۵۶۲ نمونه مورد بررسی، هفت نمونه استخراج شد و در ۶ 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]. بر اساس نتایج مطالعات Clark در سال ۱۹۹۸ حتی در نقاط شیوع آمیبازیس مهاجم، انتامبا دیسپار گونه غالب است و نسبت شیوع ۱۰ به ۱ است و تخمین می زندند. ۹۰٪ عفونت ها به دلیل انتامبا دیسپار است [۶]. با PCR در لوکوس ۱-۲ بین سوبه های انتامبا دیسپار مورد بررسی از نظر اندازه تفاوت مشاهده گردید. در تحقیق حقیقی و همکاران در سال ۲۰۰۲ پلی مورفیسم قابل توجهی از نظر اندازه، نوع و تعداد واحدها تکرارشونده در لوکوس ۱-۲ در ایزوبله های انتامبا هیستولیتیکا از نواحی مختلف جغرافیایی گزارش گردیده است [۱۴]. نکته جالب اینکه در یکی از نمونه ها که اسهالی و حاوی RBC و WBC بود، بر خلاف انتظار با PCR، سوبه انتامبا دیسپار شناسایی 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 نمی شود [۳، ۶] و فقط در موارد عفونت قطعی

- ۷- هوشیار حسین، شناسایی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار با استفاده از PCR و تعیین پراکندگی آن در سه منطقه آب و هوایی ایران. پایان نامه انگل شناسی تهران: دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۸۰-۱۳۸۱.
- 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 amoebiasis 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- Haghghi 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. Haghghi 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.
- ۲۰- هوشیار حسین، رضاییان مصطفی. تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار (ایزوله های تهران) با روش یاخته سال چهارم. شماره ۱۳۸۰. صفحات ۱۱ تا ۱۵.
- ۲۱- سلیمانی خراشاد علیرضا، بررسی میکروسکوپی و افتراق انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار با روش در مراکز درمانی زاهدان. پایان نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی، تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۱۳۸۴.
- 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- Evangelopoulos AG. Spanakos E. Patsoula N. 2000, A nested, muliplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in feaces, *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.