استنبات الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica* في الزجاج ودور النشأ في نموها

انتصار مهدي حمد الحسيني علي شاكر محمود العزي زينة غني فاضل المجمعي

كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

الخلاصة

يعد مرض الاميبا الحالة للنسيج واحداً من اخطر الامراض المعدية اذ ياتي في المرتبة الثانية بعد الملاريا كمسبب للوفاة. وقد قدرت منظمة الصحة العالمية ان هناك حوالي 50 مليون فرد في العالم يعاني من الاصابة بالاميبا الحالة للنسيج والذي يتسبب في موت 40.000 – 100.000 حالة سنوياً. تتضمن دورة حياة اميبا النسيج طورين هما الطور المتكيس Cyst والطور الخضري Trophozoite وتحدث الاصابة بالاميبا الحالة للنسيج بابتلاع الاكياس المعدية مع الماء والغذاء الملوثين. اجريت الدراسة الحالية خلال المدة من تشرين الثاني 2012 ولغاية شباط 2013 وقد تم استخدام طريقتين في التشخيص (طريقة الفحص المباشر وطريقة الاوساط الزرعية). تم فحص 202 نموذجاً من عينات البراز التي اخذت من الاطفال في مدينة بعقوبة، بلغت نسبة انتشار الاصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica* 50.4 % وكانت اعلى نسبة للاصابة في الفئة العمرية الاقل من خمس سنوات وبنسبة بلغت 46.5 % فيما كانت ادنى نسبة اصابة في الفئة العمرية من خمس سنوات فاكثر وبنسبة 3.9 %. لم يكن هناك فرق معنوي بين نسبة الاصابة في الذكور والاناث (اذ بلغت نسبة الاصابة في الذكور 25.7 % مقابل 24.7 % في الاناث) . كما لوحظ ارتفاع نسبة الاصابة في الاشخاص الذين يستعملون ماء النهر كمصدر للشرب بنسبة 43.5 % في حين كانت النسبة اقل في الاشخاص الذين يستعملون ماء البئر كمصدر للشرب (0.9 %) . سجلت نسبة اصابة عالية في الريف (26.7 %) في حين كانت النسبة اقل في المدينة (23.7 %). عزلت الاميبا الحالة للنسيج من المرضى المصابين بالطفيلي بعد ان تم فحصهم والتاكد من الاصابة وتم استخدام الوسط الزرعي LEM لنمو الطفيلي وقد تم استخدام ثلاث تراكيز للنشا في الطور الصلب للوسط الزرعي. لوحظ النمو بعد 72 – 48 من الحضانة بدرجة 37 مْ لوحظ زيادة النمو طيلة اسابيع الدراسة. لوحظ ان وجود البكتريا لايؤثر على النمو ولكن وجود الفطريات يؤدي الى هلاك وموت الاميبا . وقد لوحظ ايضاً انه عند زيادة تركيز النشأ المضاف للوسط رافقته زيادة في نمو الاميبا وزيادة اعداده وقد يعود ذلك لاعتباره مصدر غذائي لها.

الكلمات المفتاحية : طفيلي الزحار الاميبي ، انتشار طفيلي الزحار الاميبي ، الاوساط الزرعية .

Culture of *Entamoeba histolytica* in Vitro And The Role of Starch On Its Growth

Entsar M. Al-Hussuny Ali Shaker Al-Ezee Zeina Gany Fadeel Almojaamaee

College of Education for Pure Science University of Diyala .

Received 27 October 2015 ; Accepted 22 February 2015

Abstract

The present study has been carried out during the period from November 2012 to February 2013. Two methods were used for diagnosing *E. histolytica*. Two hundred and two stool samples were collected from children in Baquba city and examined. The overall rate of infection with *E. histolytica* was 50.4 %. The highest rate of infection (46.5%) was in the age group less five years while the lowest rate (3.9%) in the age group of five or more years. There was no significant difference between the infection rate among males and females (25.7% and 24.7% in males and females, respectively). The high prevalence was in people who use the river water as a source of drinking water (43.5%) while the prevalence was lower in people who use well water. The infection rate in rural areas (26.7%) was relatively higher than in the urban areas (23.7%). The parasite was cultivated in the LEM media. Three different concentrations of starch were used in the solid phase of this medium to test the role of starch in the growth of the parasite. *Entamoeb histolytica* was isolated from patients infected with the parasite. Growth was observed after 48-72 of incubation at 37 C. The growth increased throughout the period of the study. It has been observed that the presence of bacteria does not affect the growth, but the presence of fungi kills the amoeba. It was also observed that increasing the concentrations of starch enhanced the growth of the amoeba and may be due to the fact that starch is a good nutrient source.

Keywords: *Entamoeba histolytica* prevalence, amoebiasis, cultivation.

المقدمة

شخص جنس *Entamoeba* لاول مرة عام 1903 من قبل Firiz Schaudin (Adagu *et al.*,2002) (1) فيما كان Walker & Sellards اول من اشار الى الاكياس كطور معدي لهذا الطفيلي وذلك في عام 1913 Al-) (Bayatti,2002 (2) وعلى الرغم من ان اغلب حالات الاصابة بداء الاميبات Amoebiasis تكون غير مصحوبة باعراض مرضية واضحة Asymptomatic الا ان الزحار والاسهال الشديد وبعض الامراض خارج معوية extra intestinal diseases بالامكان ان تكون مصاحبة للاصابة بهذا الطفيلي (Ayeh- Kumi & Petri, 2002) (3). فالخراجات الكبدية Liver absesses تكون شائعة الحدوث بين المصابين فضلا عن امكانية حدوث اصابة لاعضاء اخرى كالرئة والقناة البولية التناسلية والقلب فضلا عن الكبد (Balci & Sirvanci,2002) (4) . يعد مرض الاميبات واحدا من المشاكل الصحية العالمية ومن اخطر الامراض المعدية وخاصة في الدول النامية ، اذ ياتي مرض الاميبات في المرتبة الثانية بعد الملاريا كمسبب للوفاة (Bhaun *et al.*,2011) (5)، فقد سجلت حوالي 40.000 – 100.000 حالة وفاة بهذا المرض سنوياً (Agha Rodina & Teoderescu. 2002) (6).

وتحدث الاصابة بالاميبا الحالة للنسيج بابتلاع الاكياس المعدية مع الماء والغذاء الملوثين (Bhaun *et al.*,2011) (5) ولهذه الاكياس القدرة على البقاء في البيئة لاسابيع او اشهر وبهذا فهي تمثل مصدرا للعدوى من خلال تلوث الاتربة والطعام والماء فضلا عن تلوث ايادي العاملين في المطاعم (Clark & Diamond,2002) (7). تنتقل الاكياس مع الماء والغذاء لتستقر في الامعاء الغليظة وتتغذى على الدقائق الغذائية والبكتريا وتهاجم جدار المعي لتتغذى على الانسجة وكريات الدم الحمر مكونة القرح ومسببة حدوث الزحار الدموي dysentery (Stanley,2001) (8). وهناك طرق عديدة لتشخيص الطفيلي منها الفحص المباشر للخروج Direct method وطريقة التركيز Concentration والطرائق المصلية والمناعية Serological Immunological methods & وطريقة الاستنبات Cultivation فضلا عن الطرائق الجزئية الحديثة Molecular methods (Stanley,2001) (8). ويعد استنبات الطفيلي في الزجاج احدى الطرائق التشخيصية المهمة وخاصة في التجارب المختبرية وبشكل خاص في عزل الطفيلي والدراسات المتعلقة بحياتية الطفيلي والجوانب الكيموحياتية وغيرها من التجارب المختلفة ((Balci & Sirvanci,2002) (4). وقد طورت عدة انواع من الاوساط الزرعية ثنائية الطور لتشمل المصول والاكار او خلاصة البيض في الوسط الصلب المائل (Ramos,2005) (9). وتوجد ثلاثة انواع اساسية للانظمة الزراعية وهي Xenic وتعني نمو الطفيلي بوجود جراثيم معوية طبيعية وغير محددة ، Monoxenic وتعني نمو الطفيلي بوجود نوع واحد من البكتريا المضافة و Axenic وتعني نمو الطفيلي بغياب اي نمو جرثومي او خلوي اخر (Clark & Diamond,2002) (7). لذا فقد اجريت هذه الدراسة بهدف دراسة وبائية الطفيلي وطرق عزله و تنميته في الوسط الزرعي Locke – Egg Medium (LEM) ولاطول فترة ممكنة ومعرفة نوع وتاثير اضافة النشأ في الوسط الزرعي .

المواد وطرائق العمل : Materials and Methods

اولا : جمع العينات :

جمعت عينات الخروج من اشخاص يعانون من الاسهال وغير خاضعين للعلاج والمراجعين للعلاج والمراجعين لمستشفى بعقوبة العام ومستشفى البتول للاطفال وذلك من خلال الفترة من تشرين الثاني 2012 ولغاية 2013 . وقد تم التاكد من اصابتهم بالاميبا الحالة للنسيج من خلال الفحص المجهري للخروج وتشخيص طوري الطفيلي Trophozoite والمتكيس Cyst بطريقة الفحص المباشر. لقد سجلت معلومات كاملة ضمن استمارة استبيان تتضمن الجنس ، العمر ، مصدر مياه الشرب والسكن .

ثانياً : فحص العينات :

تم فحص العينات التي وضعت في اوعية بلاستيكية نظيفة خلال ساعة من جمعها للتحري عن الاطوار الخضرية Trophozoites والمتكيسة Cysts لطفيلي الزحار الاميبي وتم ذلك بطريقتين :

1 – الفحص المباشر للبراز Direct Stool Examination :

اجري هذا الفحص لكل عينة من عينات البراز إذ تم تحضير شريحة زجاجية نظيفة ووضعت قطرة من المحلول

الملحي الفسلجي Normal Saline (0.85% ملح الطعام) على أحد طرفيها ثم أخذت كمية صغيرة من البراز من أماكن مختلفة من العينة بوساطة عيدان خشبية خاصة Wood sticks ومزجت العينة مع المحلول الملحي الفسلجي، وعلى الطرف الآخر من الشريحة الزجاجية نفسها، وضعت قطرة من محلول اليود، ومزجت مع كمية صغيرة أخرى أخذت من العينة ذاتها. بعد ذلك تمت تغطية الشريحة بغطاء الشريحة الزجاجية Cover slip وفحصت بالمجهر الضوئي تحت قوة التكبير الكبرى 40 X. كرر الفحص مرتين للنموذج الواحد (Garcia & Ash,1975) (10) .

2 - طريقة التركيز Concentration Method :

استخدمت طريقة التطويف الملحي المشبع Saturated salt flotation method وهي طريقة تعتمد على تحويل المحلول إلى كثافة اكبر من كثافة الطفيليات (Faust *et al.*,1970) (11). تضمنت هذه الطريقة مزج غرام واحد من البراز الحديث مع 100 مليلتر من الماء المقطر ومرر المحلول من خلال أربع طبقات من الشاش الطبي لإزالة المواد العالقة الكبيرة. طرد الناتج (المعلق) لمدة دقيقة في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 2300 دورة بالدقيقة ثم سكب الراشح وأضيف حوالي 2 مل من الماء ومزج مع الراسب. طردت العينة مركزياً مرة أخرى وبالسرعة نفسها، كررت هذه العملية إلى أن اصبح الراشح صافياً. سكب الراشح وأضيف 2 مليلتر من كبريتات الخارصين إلى حد الفوهة ثم وضع فوقها غطاء الشريحة ووضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة وبسرعة 2300 دورة في الدقيقة. رفع غطاء الشريحة وثبت على شريحة زجاجية نظيفة مع قطرة من اليود وفحص تحت القوة الصغرى ثم الكبرى (Ichhpujani & Bhatia, 1994) . (12)

ثالثاً : تنمية الطفيلي :

تحضير الوسط الزرعي Lock – Egg Medium (LEM) : تم تحضير الوسط الزرعي والذي يتكون من طورين حسب الطريقة التي استخدمت من قبل الباحثان Boeck and Drobohlav (13) وكما يلي :

1 – الطور السائل : يتكون هذا الطور بصورة اساسية من محلول لوك والذي يتالف من مزج المكونات التالية :

Sodium chloride	Nacl	9.0 g	كلوريد الصوديوم
Potassium chloride	Kcl	0.4 g	كلوريد البوتاسيوم
Glucose		2.5 g	كلوكوز
Calcium chloride	$Cacl_2$	0.2 g	كلوريد الكالسيوم
Sodium bicarbonate	NaCo3	0.2 g	بيكاربونات الصوديوم
Distilled water		1000 ml	ماء مقطر

تمزج هذه المكونات جيداً ثم تعقم بوضعها في جهاز Autoclave لمده 15 دقيقه تحت ضغط 15 باوند ودرجه حرارة 120 مْ .

2- الطور الصلب / يتكون هذا الطور بصوره اساسية من بيض الدجاج وتم تحضيره كما يلي :

A- اخذت 4 بيضات ثم غسلت وعقمت بالكحول (بواسطه مسحها بالفرشاه) ثم كسرت ووضعت في دورق زجاجي .

B- تمت اضافة 50 مل من محلول لوك المحضر الى الدورق ومزجت جيدا.

C- تم توزيع المزيج على أنابيب مختبريه ذات حجم مناسب بمقدار 5 مل لكل انبوبة اختبار وسدت الانابيب المختبريه بواسطه القطن.

D- اضيفت ثلاثة تراكيز من النشا (0.1mg and 0.3 ، 0.5) الى الوسط الزراعي وبواقع ثلاث انابيب لكل وزن فضلا عن ثلاث انابيب كسيطرة لم يستخدم فيها النشا .

E- وضعت الانابيب في حمام مائي بدرجه حرارة 70 مْ وبشكل مائل للحصول على السطح الصلب المائل .

F- غمر السطح الصلب المائل بمزيج من (32 مل من محلول لوك + 4 مل من مصل دم الانسان) حيث تمت اضافة 3.5 مل من المزيج لكل انبوبة وتركت الانابيب لمده 24 ساعة في الحاضنة بدرجه حرارة 37 مْ (Clark & Diamond,2002) (7) .

تنمية الطفيلي Cultivation of the Parasite :

اضيف 0.5 مل من المستحلب الحاوي على الطفيلي الى انابيب الاوساط الزرعية في الحاضنة وبدرجة حرارة 37 م لمدة 24ساعة (Clark & Diamond,2002) (7). تم فحص النمو بعد 24 ساعة من الزرع للتأكد من نمو الأميبا. تمت متابعة الفحص للعينات كل 24 ساعة الى ان تم التأكد من نمو الأميبا وتم تسجيل هذا الزمن لكل أنبوبة اختبار .

قياس فعالية المعاملة Activity assay :

تم قياس فعالية المعاملة بالنشأ بأستخدام المعادلة الاتيه ووفقا للطريقة المذكورة سابقا (14) :

$$\text{فعالية المعاملة (\%)} = \frac{\text{المعاملة (معدل اعداد الطور المتغذي / مل)}}{\text{السيطرة (معدل اعداد الطور المتغذي / مل)}} \times 100$$

التحليل الاحصائي Statistical analysis :

تم تحليل النتائج أعتمادا على برنامج SPSS الجيل السابع لبيان الفروقات بين المعاملات المختلفة .

النتائج Results

اظهرت نتائج الفحص المجهري لعينات البراز اصابة 102 فردا بطفيلي *Entamoeba histolytica* من مجموع 202 حالة تعاني من الاسهال وبهذا بلغت نسبة الاصابة 50.4% كما هو موضح في الجدول رقم (1). ان ارتفاع نسبة الاصابة بالطفيلي تتفق مع ماتوصل اليه الباحثان Chazal and Adi (15) (27.81). وقد يعزى ذلك الى طريقة انتشار الطفيلي المباشرة عن طريق الماء والغذاء الملوثين باكياس الطفيلي التي تتميز بمقاومتها العالية للمعقمات الكيمياوية كالكلور وكذلك مقاومتها للظروف البيئية القاسية كالجفاف والمدى الواسع للـ pH القيسي وسلطان (18).

جدول (1) : نسبة الاصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica* .

الطفيلي	عدد العينات المفحوصة	عدد المصابين	نسبة الاصابة %
Entamoeba histolytica	202	102	%50.4

ان اعداد المصابين من الذكور والاناث متقاربة (جدول 2) ولم تظهر هناك فروق معنوية بين المجموعتين وتتفق هذه النتائج مع نتائج الدراسات السابقة Chazal and Adi (15)، التكريتي وجماعته (16) (الذكور31.2 والاناث 30.3)، Arani وجماعته (17) (الذكور 1.3 والاناث 0.9)، القيسي وسلطان (18) (الذكور 55.5 والاناث 44.5) الا ان هذه النتائج جاءت مخالفة لما توصل اليه الباحث Oguntibeju (19) (الذكور 45 والاناث 55) وكذلك الباحث Al-Khushali (20) (الذكور 42.6 والاناث 31.7)، وقد يعود السبب في ذلك الى تساوي فرص الاصابة بالنسبة للمجموعتين وعدم العناية بالنظافة وتناول الغذاء من الاراضي الملوثة صلبي ورشيد (21) . ويدعم ذلك ان اغلب المصابين هم من الفئة العمرية الاقل من 5 سنوات اذ تمتاز هذه الفئة بالنشاط واللهو فضلا عن وجود افراد من هذه الفئة لايمشون وانما يحبون مما يزيد فرص تعرضهم للاصابة حنتوش (22) .

جدول (2) : علاقة الاصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica* بالجنس .

الجنس	غير المصابين	نسبة الاصابة %	المصابين	نسبة الاصابة %	P. value
ذكور	56	27.7	52	25.7	0.475
اناث	44	21.7	50	24.7	
المجموع	100	49.5	102	50.4	

وفيما يخص العمر يوضح الجدول (3) ان اعلى نسبة للاصابة بالطفيلي كانت في الاطفال بعمر اقل من خمس سنوات بنسبة (46.5 %) في حين تنخفض النسبة في عمر خمس سنوات فاكثر وبنسبة (3.9%) وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما توصلت اليه نتائج الدراسات السابقة Tsuyuoka وجماعته (23) (24.1 %)، Oguntibeju (19) (9%)، القيسي وسلطان(18) (39.5%)، Al-Khushali (20) (38.5%). الا انها لاتتفق مع ماتوصلت اليه دراسات اخرى Chazal & Adi (15) (48%)، التكريتي وجماعته (16) (16.1%)، Arani وجماعته (17) (18.7%). ان سبب ارتفاع نسبة الاصابة بالطفيلي قد يعود الى ميل الطفل للعب في بيئة اكثر عرضة للتلوث بالاطوار المعدية للطفيلي Al-Hanoon & Mukhlis (24). وان اغلب افراد هذه الفئة هم معتمدين على امهاتهم من ناحية النظافة الشخصية Belding (25) .

جدول (3): علاقة الاصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica* بالعمر .

العمر (سنوات)	غير المصابين	نسبة الاصابة %	عدد المصابين	نسبة الاصابة %	P. value
< 5	66	32.6	94	46.5	0.000
5 فاكثر	34	16.8	8	3.9	
المجموع	100	49.5	102	50.4	

وقد ترتبط هذه الزيادة بمصدر مياه الشرب اذ اظهرت النتائج ان اعلى نسبة للاصابة (43.5 %) كانت لدى الاشخاص الذين يشربون ماء النهر تلتها النسبة في الاشخاص الذين يشربون ماء الاسالة (5.9 %)، في حين سجلت اقل نسبة للاصابة لدى الاشخاص الذين يشربون ماء البئر بنسبة (0.9 %) جدول (4) . وهذه النتيجة جاءت متفقة مع النتائج التي توصل اليها الباحث Ouattara وجماعته (26) (0.84%). الا انها جاءت مخالفة لما توصل اليه القيسي وسلطان (18) (اسالة 53.5 ، النهر 52.6) وقد يعزى سبب ارتفاع نسبة الاصابة في ماء النهر والاسالة الى ان مياه الاسالة قد تكون غير معقمة بشكل صحيح او عدم اضافة مادة الكلور بصورة كافية العنبكي (27)،

فيما تكون مياه النهر عرضة لرمي فضلات الانسان المليئة بالاطوار المعدية للطفيلي وقد تستعمل من قبل الانسان بدون معالجة هذه المياه الملوثة بصورة صحيحة الكبيسي (28) . سجل ماء البئر اقل نسبة للاصابة لانه اقل عرضة للتلوث بمصادر تلوث المياه كالتلوث بالغائط او مياه الصرف الصحي(Angelakiasa & Spridakis,1995) (29).

جدول (4): توزيع الاصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica* وفقا لمصدر مياه الشرب .

مصدر الماء	غير المصابين	نسبة الاصابة %	عدد المصابين	نسبة الاصابة %	P. value
اسالة	31	15.3	12	5.9	0.000
نهر	42	20.7	88	43.5	
بئر	27	13.3	2	0.9	
المجموع	100	49.5	102	50.4	

يوضح الجدول (5) ان نسبة الاصابة بالطفيلي في الريف اعلى نسبيا حيث بلغت (26.7 %) مقارنة مع النسبة في المدينة والتي بلغت (23.7 %) وهذا يتفق مع ماتوصل اليه التكريتي وجماعته (16) (الريف 32.6% ، المدينة 38.1%) والقيسي وسلطان (18) (الريف 55.6% ، المدينة 53.4%). يعزى السبب في ارتفاع نسبة الاصابة عند الريف الى وجود مصادر التلوث منها استخدام مياه الانهار التي تحمل الكثير من الطفيليات واطوارها .

جدول (5): توزيع الاصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica* وفق منطقة السكن

السكن	غير المصابين	نسبة الاصابة %	المصابين	نسبة الاصابة %	P. value
ريف	67	33.1	54	26.7	0.04
مدينة	33	16.3	48	23.7	
المجموع	100	49.5	102	50.4	

استخدم الوسط الزراعي LEM والحاوي على المصل طيلة مدة البحث (تم اختيار مصل الدم للانسان في الوسط). لوحظ النمو بعد 24 – 72 ساعة من الحضانة بدرجة حرارة 37 مْ وقد لوحظ زيادة النمو طيلة اسابيع الدراسة وبمعدل (0.94×10^6/ مل) للاسبوع الاول و (1.38×10^6/ مل) للاسبوع الثاني . وقد تم ادامة المستنبت كل 48 ساعة . لوحظ خلال الدراسة ان وجود البكتريا لايؤثر على النمو فيما كان لوجود الفطريات تاثير سلبي على النمو اذ يؤدي وجود الفطريات الى موت الاميبا وقد لوحظ ان التكيس قد يحدث في حالة تاخر الادامة لاكثر من اسبوع . تم اضافة تراكيز مختلفة من النشأ لملاحظة تاثير النشأ (كمصدر للكاربوهيدرات) على نمو الطفيلي وقد لوحظ ازدياد النمو بزيادة تراكيز النشأ وكما مبين في جدول (6) . وقد سجلت فروقات معنوية خصوصاً للتركيز الاعلى (0.5) للنشأ على نمو طفيلي الاميبا الحالة للنسيج والنامية في الوسط الزرعي LEM

المجاميع	تركيز النشأ	معدل اعداد الطفيلي $\pm$ الخطأ القياسي (10^6/مل)	فعالية المعاملة في الوسط (%)
السيطرة	0.0	$0.134 \pm 10^6 \times 0.56$	----
مجموعة A	0.1	$0.089 \pm 10^6 \times 0.62$	10.719
مجموعة B	0.3	$0.152 \pm 10^6 \times 0.933$	66.607
مجموعة C	0.5	$0.083 \pm 10^6 \times 1.082$	92.857

وقد ظهر وجود فروق معنويه ($P<0.0001$) بين التركيز الثاني للنشأ مقارنه مع السيطرة وبين التركيز الثالث للنشا مع السيطرة ($P<0.01$) في الوسط الزرعي . فيما لم تكن هناك فرق معنوي بين التركيز الاول للنشا مقارنة بالسيطرة على الرغم من زيادة معدل التضاعف للاميبا في هذا التركيز . تم تجهيز الوسط الزرعي بالمواد الغذائية الضرورية للنمو والتي تشمل البروتينات والكاربوهيدرات والدهون (البيض).

وقد بينت النتائج نجاح عزل الاميبا من البراز وتنميتها على الوسط الزرعي LEM وهذا ما اكدته دراسة الباحث Ramos وجماعته (9).

في حين اكد الباحثان Diamond&Clark (7) إن الوسط LEM هو من الاوساط المهمة الذي يظهر دقة عالية في تشخيص الاصابة بالاميبا الحالة للنسيج في البراز. تم ادامة المستنبت كل 48 ساعة واظهرت الدراسة زيادة معدل تضاعف الاطوار المتغذية في 48 - 72 ساعة بعد التلقيح للوسط الزرعي ثم يبدأ بعد ذلك بالانخفاض وهذا يتفق معنتائج الباحثان اعلاه Diamond& Clark (7) اذ اكدا على إن معدل التضاعف يصل الى اعلى مستوى له بعد 48 ساعة للتلقيح في الاوساط التي استخدماها . اظهرت النتائج ايضا بأن الاطوار المتغذية تنمو الى جنب مع البكتيريا السالبة لصبغة كرام *E. coli* وهذا يتفق مع نتائج الدراسة التي قام بها الباحثBhaun وجماعته (5) إذ ان الاميبا تتغذى على هذه البكتيريا. وفي هذه الدراسة فقد تم تزويد الوسط بالبكتيريا بصوره طبيعية لوجودها في براز المصابين . لوحظ ايضا من النتائج إن وجود الفطريات يؤدي الى هلاك الاميبا وعدم حدوث نمو وقد يعود السبب في ذلك الى افرازات الفطريات السامة (1). وقد لوحظ من النتائج إن استخدام النشا ادى الى زيادة في النمو للاميبا بأعتباره مصدرا غذائيا مهما Diamond & Clark (7) ومن الدراسة الحالية يمكن الاستنتاج ان الوسط الزرعي LEM يعد ملائما لاستزراع الاميبا ولعزل وتشخيص الطفيلي وان وجود النشا في هذا الوسط يعد عاملا اضافيا لزيادة نمو الاميبا .

References

1. Adagu, l.S., Nolder, D., Warhurst, D.C. & Rossignol. J.F. (2002) . In vitro activity of nitazoxanide & related compounds against isolates of *Giardia intestinales* , *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. J. Antimicrob . Chemother . , 49 : 103 – 111.

2. Al – Bayatti , S.M.(2002) . Etiology of chronic diarrhea . Saudi Med . J. , 23 : 675 - 679.

3. Ayeh - Kumi ,P.E.& P.E & Petri , W.A. (2002) . Diagnosis & management of amebiasis . Infect. Mal ., 19: 375 - 382.

4. Balci, N. C. & Sirvanci, M. (2002). MR. imaging of infective liver lesion. Magn. Reson. Imaging Cl. N. AM., 10 : 121 – 135 .

5. Bhaun, S. ; Vandana, S. & Archana, S. (2011). In vitro study of *Entamoeba histolytica* causative agent of amoebiasis with lemon juice at different concentration showed antiamoebie properties. Internat. Res. J. Pharm., 2 (9) : 88 – 90 .

6. Agha Rodina , Al . & Teoderescu , l . (2002) . prevalence of intestinal Parasite in three localities in Gaza Governorate –Palestine . Arch .Publ . Health ., 60 : 363 – 370 .

7. Clark, C. G. & Diamond, L. S. (2002). Methods for cultivation. Microbial. Rev., 15 : 329 – 341 .

8. Stanley, S. L. (2001). Pathophysiology of amebias. Trends Parasitology., 17 : 280 – 285 .

9. Ramos, F. ; Moran, P. ; Gonzalez, E. ; Garcia, G. ; Ramro, M. ; Gomez, A. ; Garcia de Leon, M. C. ; Melendro, E. I. ; Valadez, A. & Ximenez, C. (2005). *Entamoeba histolytica* & *Entamoeba dispar* prevalence infection in aural Mexican community. Exp. Parasitol., 110 : 327 – 330 .

10. Garcia, L. S. & Ash, L. R. (1975) . Diagnostic parasitology : Clinical laboratory manual. C. V. Mosby Co., Saint Louis : 112 pp.

11. Faust, E. C. ; Russell, P. F. & Jung, R. C. (1970) . Craig and Faust's clinical parasitology , 8th edn., Lea & Febiger , Philadelphia : 890 pp .

12. Ichhpujani, R. L. & Bhatia, R. (1994). Medical Parasitology. Jaypee Bros . Med . Publ ., New Delhi : 384 pp .

13. Boeck, W. C. & Drobohlav, J. (1925). The caltivation of *Entamoeba histolytica.* Am. J. Hyg., 5 : 371 – 407 .

14. Lwin, K.M. & Oo, M. (2004). In vitro antiamoebicidial activity of (Dysenzil) on *Entamoeba histolytica* in culture. FAME. Pharmoceuticals. Internet : http : // Famepharma. Com.

15. Chazal, A. M. & Adi, H. K. (2007). The Prevalence of intestinal parasites in Amman, Jordan. Bull. Pharm. Sci., Assist University, 30 (2) : 235 – 239 .

16. التكريتي ، الهام عائد اسعد و الجبوري ، عبد الخالق علوان و التكريتي ، علي حسين الطيف (2007) . انتشار طفيلي الزحار الاميبي *Entamoeba histolytica* في بيجي وضواحيها وتاثير مستخلصات قشور الرمان *Punica granatum* في نمو الطفيلي بالوسط الزرعي . رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة تكريت .

16. Arani, A.S.; Alagheh bandan, R. ; Akhlaghi, L. ; Shahi, M. & Lari, A.R.(2008). Prevalence of intestinal parasites in apopulation in south of Tehran, Iran. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo , 50 (3) : 145 - 149 .

17 . القيسي ، غسان حمدان و سلطان ، عمار احمد (2008). العوامل المؤثرة على وبائية طفيلي *Entamoeba histolytica* وطفيلي *Giardia lamblia* بين سكان قضائي الخالص وبلدروز . مجلة جامعة ديالى – كلية التربية . 27 : 92 – 99 .

18. Oguntibeju, O. O. (2003). Parasitic Infestation and Anaemia : The Prevalence in a Rural Hospital Setting . JIACM., 4 (3) : 210 – 212 .

19. Al-Khushali, M. N. (2012). Toxoplasmosis in Relation to *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* Infection . Diyala Journal of Medicine, 2 (1) : 37 – 45 .

20 .صلبي، أحسان محمد ورشيد ، إبراهيم فضل (2010) . دراسة في وبائية لمسببات الإسهال الطفيلية للإنسان في منطقة كربلاء . وقائع المؤتمر العلمي العاشر لكلية الطب البيطري : 265 - 271 .

21 .حنتوش ، الاء شاكر (1998) . دراسة انتشار الطفيليات المعوية وتاثير تعدد الاصابة على مستوى الهيموكلوبين وحجم كريات الدم المرصوصة في مدينة النجف . رسالة ماجستير ، كلية القائد ، جامعة الكوفة .

22. Tsuyuoka, R. ; Bailey, J. W. ; Guimaraes, A. M. N. ; Gurgel, R. Q. & Cuevas, L. E. (1999) . Anemia and intestinal parasitic infections in primary school students in Aracaju, Sergipe, Brazil . Cad. Saude Publica, Rio de Janeiro, 15 (2) : 413 – 421 .

23. Al-Hanoon, Z. & Mukhlis, S. (1982). Prevalence of intestinal parasite among secondary school students in Mosul. Iraq. J. Fac. Med. Baghdad., 24 (4) : 225 pp.

24. Belding, D.L. (1965). Textbook of parasitology . 3rd Ed, Appleton Century-Crafts . New York .

25. Ouattara, M.; Guessan, N.A. ; Yapi, A. and Goran, N.E.K. (2010).Prevalence and spatial distribution of *Entamoeba histolytica / dispar* and *Giardia lamblia* among school children in Agboville area (Cote d lvoire) . Plos Negl. Trop. Dis ., 4(1): e574 – e578 .

26 .العنبكي ، قدس علي احمد (2002) . دراسة بعض الجوانب المناعية والمرضية للإصابة بطفيلي *Giardia lamblia* . رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية : 86 صفحة .

27 .الكبيسي، علي حسين مكي (2000) . دراسة بعض الجوانب الوبائية للطفيليات المعوية في محافظة بابل / العراق . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بابل : 48 صفحة .

28. Angelakiasa , A. N. & Spridakis, S. (1995) . The status of water resources in Minion times:a preliminary study