

計畫編號：DOH91-DC-2020

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

致病性阿米巴痢疾之鑑別診斷

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局研究檢驗組

計畫主持人：鄧洪音

研究人員：蕭偉宏、江峻昇、詹韻仙

執行期間： 91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 \*

# 目錄

	頁碼
封面	
目錄	( 2 )
摘要	( 3 )
前言	( 7 )
材料與方法	( 10 )
結果	( 15 )
討論	( 17 )
結論與建議	( 18 )
參考文獻	( 19 )
圖	( 21 )
表	( 27 )

## 摘要

法定傳染病阿米巴痢疾之致病原為單細胞原蟲痢疾阿米巴 (*Entamoeba histolytica*)，主要寄生在人類的腸道，亦可能伺機侵入組織造成其他病變，如腸炎或膿瘍。阿米巴痢疾的臨床檢驗主要所恃乃型態學之描述，亦即自糞便檢體中顯微鏡檢查出痢疾阿米巴原蟲之囊體或活動體；但在另一方面，許多糞便鏡檢結果陽性但無症狀的病例引發一些爭議，如：「致病性」是單一原蟲物種的特性亦或寄主環境等客觀條件所致？型態學描述是否足以界定此一致病原？經近二十年有關於阿米巴原蟲之生化、免疫、遺傳等特徵的探討後，WHO/PAHO/UNESCO 之專家會議終於 1997 年取得共識，原先糞便鏡檢認定之痢疾阿米巴原蟲至少可進一步區分為兩種原蟲：*Entamoeba histolytica* 與 *Entamoeba dispar*，前者可能侵入組織造成病變，為治療、防治之真正目標，後者僅為共生之腸道原蟲，無須投藥治療。針對此一事實，檢驗室無法再以鏡檢結果來判定阿米巴痢疾，必須開發建立新的鑑別檢驗方法來因應，我們利用兩種原蟲 small subunit ribosomal RNA 基因 (SSU-rDNA) 序列之些微差距 (35/1950；1.7%) 及該基因之 multiple copies 之性質，建立一套直接從糞便檢體中抽取核酸，復以聚合酵素連鎖反應增殖 SSU-rDNA 之特定片段來鑑別檢驗阿米巴痢疾，本計畫所建立之系統可以檢測出糞便檢體中單

一之原蟲細胞，此為分子檢測靈敏度之極限，同時我們也將此檢驗系統應用於一台灣阿米巴高危險族群進行盛行率之調查，在總數 442 人中，經鏡檢初步篩檢後發現 38 例為 *E. histolytica*/*E. dispar*，再以 PCR 檢測後，15/38 ( 39.5% ) 感染 *E. histolytica*，23/38 ( 60.5% ) *E. dispar*，所有感染者皆無臨床症狀。

**關鍵詞**：痢疾阿米巴、鑑別診斷、聚合酵素連鎖反應

## 英文摘要

Amebic dysentery, one of notifiable parasitic diseases in Taiwan, is caused by the protozoan *Entamoeba histolytica*. *E. histolytica* resides mostly in the intestinal tract of human host. It may further invade the tissue and cause severe colitis and abscess. The clinical diagnosis of intestinal amebiasis mainly relies on the microscopic examination of *E. histolytica* cysts and/or trophozoites in the fecal specimen. However, the controversial issue concerning the pathogenicity of amebic infection was raised by the fact that most of the fecal examination positive patients do not show any symptom of diseases. Whether pathogenic *E. histolytica* can be fully described morphologically or the pathogenicity is a characteristics related to the host or environmental factors was an open question then. It took nearly two decades to solve this puzzle through research work in the fields of biochemistry, immunology and genetics concerning pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba* species. Consensus was reached in the amebiasis specialist meeting held by WHO/PAHO/UNESCO in 1997. The original '*E. histolytica*' cysts and/or trophozoites observed under microscopic examination are indeed composed of at least two species of protozoa: *E. histolytica* and *E. dispar*. The former one is pathogenic and may cause severe disease. Treatment, control and prevention measures should be taken. The latter one is merely nonpathogenic symbiotic ameba residing in the human intestinal tract. Differential diagnosis of *E. histolytica* from *E. dispar* is a must before a treatment and/or control measure can be taken. In this research project, a strategy for the differential diagnosis of *E. histolytica* and *E. dispar* was developed. By *in vitro* amplification of specific fragment of small ribosomal RNA genes of both *E. histolytica* and *E. dispar* directly out of fecal specimen, we are able to distinguish this two species of

protozoa. A single protozoan cell (cyst or trophozoite) from the fecal specimen can be detected and this corresponds to the sensitivity limit of molecular diagnosis. Besides, this approach was applied to a survey of prevalence rate in an amebiasis risky population. Out of 442 inpatients, 38 were first screened as *E. histolytica/dispar* by microscopic examination. 15/38 ( 39.5% ) are infected by *E. Histolytica*, whereas 23/38 ( 60.5% ) *E. dispar*; none of them are symptomatic.

Keyword: *Entamoeba*, differential diagnosis, polymerase chain reaction

## 前言

阿米巴痢疾 ( amoebiasis ) 是一種由痢疾阿米巴原蟲 ( *Entamoeba histolytica* ) 所引致的疾病，它主要寄生於腸道，可能伺機穿過腸道黏膜進入身體其他器官；其主要症狀為下痢、腸炎，重者可能引發肝膿瘍 ( liver abscess )。阿米巴痢疾的生活史有囊體 ( cyst ) 和活動體 ( 又稱營養體、trophozoite ) 兩個階段，活動體是主要進行細胞代謝及繁殖功能者，離開寄主後極易死亡；囊體為糞便檢體常見者，能耐惡劣的體外環境，它的傳染途徑主要是糞口 ( fecal-oral ) 傳染，囊體攜帶者 ( carrier ) 成為傳染之主源。全球每年估計有五億人感染阿米巴痢疾，導致十萬人因此死亡，世界衛生組織將之列入極重要之熱帶腸道寄生蟲傳染病。

人類感染阿米巴痢疾的病例於 1875 年首度發表，1903 年正式命名其病原體為痢疾阿米巴原蟲 ( *Entamoeba histolytica* )，爾後此一型態完全一樣的原蟲也出現在許多無症狀「病人」( asymptomatic carriers ) 的糞便檢體中，1925 年 Emile Brumpt 將這類無致病之原蟲重新命名為新種 *Entamoeba dispar*，以示與 *E. histolytica* 區隔，其間雖有學者提出致病性與否是隨寄主環境等條件而異，新種 *Entamoeba dispar* 並不存在；但在歷經近二十年的研究探索，Diamond 與 Clark [1993] 綜舉生化、免疫與遺傳方面之證據重新再定義 *E. histolytica* ( 致

病性, invasive, pathogenic, P) 及 *E. dispar* (非致病性, noninvasive, nonpathogenic, NP) 為兩個型態相同的 species。WHO/PAHO/UNESCO 於 1997 年召開阿米巴痢疾專家會議, 針對阿米巴痢疾之防治策略做革命性的結論與建議[Anonymous, 1997]: 阿米巴痢疾之定義為 *E. histolytica* 之感染且無論是否有臨床上的症狀發生。如果只感染了 *E. dispar*, 勿須投藥治療。

但是在臨床上, 唯一所恃之顯微鏡檢查無助於鑑別診斷與治療。鏡檢中如發現營養體吞噬紅血球, 或是在組織切片中發現營養體, 則可診斷為 *E. histolytica*; 如果只發現囊體, 應診斷為 *E. histolytica/E. dispar*。Sargeant 等[Sargeant et al., 1978]利用生化分析 isoenzyme pattern analysis 來區分 *E. histolytica* 與 *E. dispar*, 之後 immunology 及 genetics 方面也分別提出鑑別的依據[Strachan et al., 1988; Tannich et al., 1989], 但是這些分析法均無法有效地輔助鏡檢, 作為臨床上的檢驗工具。

雖然有些感染 *E. histolytica* 的人也沒有症狀, 但是 *E. histolytica* 可能侵入黏膜, 造成潰瘍或是膿瘍; 而感染 *E. dispar* 不致造成上述後果[Tannich, 1998]。據估計, *E. histolytica* 感染在非洲南部非常流行, 但在其他阿米巴症流行地區, 如: 印度及中美洲, 而其中 *E. dispar* 與 *E. histolytica* 的感染率約為十比一, 至於其他地區, invasive



amoebiasis 更是極度稀有[Clark, 1998]。台灣地區將阿米巴痢疾列為第二類法定傳染病，主要感染者為精神療養院及啟智教養機構之病人、院生、男同性戀者及外籍勞工等；在現行外勞管理辦法規定下，外籍勞工在健檢中一旦於糞便鏡檢中被檢出「痢疾」阿米巴將被遣送出境。現行對於所有之阿米巴症均逕行投藥治療或強制遣返的政策均應進行檢討。

本研究計劃針對前述問題提出解決之道：開發一正確靈敏並有效的治病性痢疾阿米巴鑑別檢驗方法來輔助傳統鏡檢之不足。檢驗方法之依據為遺傳學的證據[Huston, *et al.* 1999]，主要是針對 *Entamoeba* 所特有的 episome (extrachromosomal circular plasmid) [Bhattacharya *et al.*, 2000]，Episome 在單一細胞內可有超過 200 copies，其中所含 rRNA genes 成為現行最常用的基因鑑定標的；利用聚合酵素鏈鎖反應 (PCR) 技術可依據這些基因序列差異來鑑別 *E. histolytica* 與 *E. dispar*。痢疾阿米巴之試管培養極為不易，檢驗必須直接針對糞便檢體中以個數字計的阿米巴原蟲細胞進行核酸抽取及 PCR 專一增殖反應，除了技術層面的開發外，本計劃同時也將此方法應用於阿米巴痢疾之高危險群以從事盛行率調查及流行病學之研究。

## 材料與方法

### 材料

ProSpecT<sup>®</sup>痢疾阿米巴微分析盤檢驗套組(ProSpecT<sup>®</sup> *Entamoeba histolytica* Microplate Assay 購自 Alexon( USA ), Guanidine thiocyanate 購自 Amersham Pharmacia Biotech( USA ), 矽藻土( Celite )購自 Merck ( Germany ), AmpliTaq<sup>®</sup> DNA polymerase 購自 Applied Biosystems ( USA ), 3:1 NuSieve agarose 購自 Cambrex ( USA ), Chelex<sup>®</sup> 購自 Bio Rad ( USA ), 痢疾阿米巴蟲株 HM1:IMSS 購自 ATCC ( USA ), 其他藥品均為試藥級。

### 檢體來源

一台灣南部啟智教養機構之院生 ( 共 442 名 ) 之新鮮糞便採集後 , 暫置於 4 °C 冰箱 , 於 8 小時內處理或檢驗。所有採集之檢體先以 ProSpecT<sup>®</sup>痢疾阿米巴微分析盤檢驗套組(ProSpecT<sup>®</sup> *Entamoeba histolytica* Microplate Assay) 利用酵素免疫分析法 ( enzyme immunoassay, EIA ) 來偵測糞便中痢疾阿米巴特有的抗原 ( *Entamoeba histolytica* specific antigen, EHSA ) 。其中 38 人呈現 EIA 陽性 , 糞便檢體隨後以硫汞 - 碘 - 甲醛離心濃縮法 ( merthiolate-iodine -formaldehyde concentration method, M.I.F.C. ) 或經 PVA 固定及

trichrome stain 後於顯微鏡下確認阿米巴原蟲之囊體或活動體之存在。另外將鏡檢陽性個案之糞便檢體進行 DNA 抽取及聚合酵素鏈鎖反應進行阿米巴種別鑑定。

### 檢體 DNA 抽取

自糞便檢體中抽取 DNA 係參考 Boom 等[Boom *et al.* 1990]及 Walsh 等[Walsh *et al.* 1991] 之方法並加以修飾；取約 1 公克新鮮糞便與 5 ml 之 6M guanidine thiocyanate (GIT) 混合震盪均勻後，離心 (14,000 x rpm) 5 分鐘，取 450  $\mu$ l 上清液移入另一試管，另加入 50  $\mu$ l 10% Triton X-100，混合後在室溫下靜置至少 10 分鐘後，可保存於 -20 或進行 DNA 抽取。抽取 DNA 時在溶液內加入 40  $\mu$ l 矽藻土 (Celite) 溶液 (10g Celite 溶於 50ml 蒸餾水及 0.5ml 32 % HCl)，室溫振搖 10 分鐘，離心 (14,000 x rpm) 1 分鐘後移除上清液，以 1 ml 6 M GIT 清洗矽藻土一次，再以 1 ml 70 % ethanol 清洗一次，離心 (14,000 x rpm) 2 分鐘後移除上清液，開蓋置於 60 乾浴槽乾燥 10 分鐘；最後加入 120  $\mu$ l 10% chelex® in TE buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)，置於 60 溫控震盪器內振搖十分鐘，然後離心 (14,000 x rpm) 3 分鐘，取含 DNA 之上清液，置-20 保存或進行阿米巴種別鑑定 PCR。

### 種別鑑定 PCR 引子 (primer) 之設計

引子之設計是根據 GenBank 資料庫之 *E. histolytica* 和 *E. dispar* 的 small subunit ribosomal DNA (SSU-rDNA) 序列，其基因庫之索引號碼及其 DNA 序列長度分別是 *E. histolytica*:gi 9283/emb X56991( 長度 1947-bp ); *E. dispar* : gi 1212896/emb Z49256 ( 長度 1949-bp ) [Evangelopoulos et al. 2000]，以 GCG 系統 ( Genetic Computer Group package ) 進行比對而設計，設計為巢式( nested )暨兩階段式( two step ) 以增加敏感度並利用引子 3' 端對兩者序列之選擇性粘合為原則，可同時對兩個種別進行鑑別，引子的特異性經由 BLAST 程式對 GenBank 資料庫進行搜尋比對及 PCR 產物直接定序而確認 [Altschul et al. 1997]，*E. histolytica* 和 *E. dispar* SSU-rDNA 序列之比對及引子所在相對位置詳見圖一，引子之名稱及 DNA 序列見表一。

### 痢疾阿米巴蟲株培養

為探討本計劃所開發的檢驗系統之正確性及敏感度，我們利用一標準購自美國 ATCC 之痢疾阿米巴蟲株 HM1:IMSS，培養係參考 Diamond 等所開發的培養基及培養條件[Diamond *et al.* 1978]，培養之活動體細胞經離心回收後以血球計數器 ( haemocytometer ) 計算細胞數目。

### 聚合酵素鏈鎖反應

第一階段反應使用 outer1/outer1R 及 uidA1/uidA2 二對引子，前者可同時增殖兩個種別阿米巴 SSU-rDNA 823-bp 之基因片段，後者可增殖糞便中大腸桿菌 *Escherichia coli* 之 uidA 基因 320-bp 基因片段，作為 PCR 反應是否成功之指標 ( internal control )。第一階段反應包括：5  $\mu$ l DNA template，0.5  $\mu$  M outer1/outer1R 及 UidA1/UidA2，PCR buffer ( 10 mM Tris/HCl, pH 8.3, 50 mM KCl )，200  $\mu$  M dNTP，1.5 mM MgCl<sub>2</sub>，2 % ( w/v ) Sucrose，0.1 mM Cresol Red，0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA，0.05 U/ $\mu$ l AmpliTaq<sup>®</sup> DNA polymerase，反應總體積為 50  $\mu$ l，反應在 GeneAmp PCR 9700 聚合酵素鏈鎖反應器 ( Applied Biosystems ) 進行，首先在 94  $^{\circ}$ C 加熱 2 分鐘，緊接進行 35 個循環反應，每個循環包括：94  $^{\circ}$ C  $\times$ 15 秒，47  $^{\circ}$ C  $\times$ 15 秒，72  $^{\circ}$ C  $\times$ 1 分鐘，最後以 72  $^{\circ}$ C  $\times$ 6 分鐘終止反應。第二階段反應使用 Eh1/Eh2 及 Ed1/Ed2 兩引子對，前者可增殖第一階段反應產物中 *E. histolytica* SSU-rDNA 之 447-bp 之基因片段，後者可增殖 *E. dispar* SSU-rDNA 之 603-bp 之基因片段。第二階段反應包括：2.5  $\mu$ l 第一階段反應產物，0.5  $\mu$  M Eh1/Eh2 及 Ed1/Ed2，1X PCR buffer ( 10 mM Tris/HCl, pH8.3, 50 mM KCl )，200  $\mu$  M dNTP，1.5 mM MgCl<sub>2</sub>，2% ( w/v ) Sucrose，0.1 mM Cresol Red，0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA，0.05 U/ $\mu$ l AmpliTaq<sup>®</sup> DNA polymerase，反應總體積為 25  $\mu$ l。在 94  $^{\circ}$ C 加熱 2 分鐘後，進

行 35 個循環反應，每個循環包括：94 °C ×15 秒，52 °C ×15 秒，72 °C × 40 秒，最後以 72 °C ×6 分鐘終止反應。反應終止後取 5 μl 進行 3 % 洋菜膠 (3:1 Nusieve agarose gel) 電泳，以 0.5 μg/ml ethidium bromide (EtBr) 染色後，在紫外燈照射下，檢視增幅後的產物長度並與 DNA 長度指標比較判讀 (圖二)。

### DNA 定序確認

PCR 產物 DNA 由洋菜膠中回收純化後，使用自動定序儀 (automated DNA sequencer) 進行 PCR 核酸直接定序 (PCR direct sequencing)。所得之 DNA 序列再以 GCG 系統 (Genetic Computer Group package) 與 GenBank 資料庫之 *E. histolytica* 和 *E. dispar* 的 small subunit ribosomal DNA (SSU-rDNA) 序列進行排列比對 (alignment) 分析。

## 結果

本研究計劃在第一年希望建立可區分致病性與非致病性痢疾阿米巴原蟲的分子檢測方法，其原理是依據 *E. histolytica* 與 *E. dispar* 的 SSB-rRNA 基因序列差異設計 PCR 反應之引子（圖一，表一），*E. histolytica* 與 *E. dispar* 的 SSB-rDNA 約有 1,950 個鹼基對（base pair；bp）長，其中僅有 35 個 bp 相異，第一階段之 PCR 係利用二者皆具之序列增殖一 823 bp 之片段，此片段含有 *E. histolytica* 與 *E. dispar* 一些相異的序列；第二階段則利用這些不同的序列分別增殖一 447 bp（*E. histolytica*）或 603 bp（*E. dispar*）之基因片段，PCR 增殖後之產物可在洋菜電泳膠上清楚區分出來（圖二）。反應終產物之基因序列也經 DNA 定序比對後證實分別為 *E. histolytica* 或 *E. dispar* 的序列。

除了分子檢測之正確性外，我們也探討此一檢驗法之敏感度，我們利用一標準購自美國 ATCC 之痢疾阿米巴蟲株 HM1:IMSS，經實驗室無菌培養，並在顯微鏡下記數原蟲活動體數目後，定量加入（spike）1 g 新鮮陰性檢體糞便內，進行如實驗步驟所述 DNA 抽取及 PCR 反應，結果呈現於圖三，實驗證實只要有一個痢疾阿米巴細胞在糞便檢體裡，該系統都能無誤地偵測到並判別其種別，這是分子檢測敏感度的極限；另一方面，我們也自猴子糞便中採集並純化適量的阿米巴原蟲 *Entamoeba polecki* 囊體，進行同樣的連續稀釋、spike、抽取 DNA 及 PCR 反應，結果與培養株 *E. histolytica* 活動體一樣，證實我們所建立的這一套系統是現今最有效率且正確的鑑別診斷法。

我們也將此檢驗系統初步應用於一台灣阿米巴高危險族群之盛行率調查及流行病學研究計畫，在總數 442 人中，先經 ELISA 試劑併鏡檢篩檢後發現 38 例為 *E. histolytica*/*E. dispar*，再重新採取新鮮糞

便檢體經上述 PCR 等方法鑑別診斷後，發現 15 例（39.5%）感染 *E. histolytica*，23 例（60.5%）感染 *E. dispar*，所有感染者皆無臨床症狀。



## 討論

為因應世界衛生組織等關於阿米巴痢疾臨床檢驗之要求，作為該疾病之權責檢驗參考實驗室，我們嘗試建立了一種實驗室鑑別診斷致病性與非致病性痢疾阿米巴系統，此一系統應具有正確性及高的靈敏度，前者主要是利用 *E. histolytica* 與 *E. dispar* 在 SSU-rDNA 序列上及微小但顯著之差異設計合適的 PCR 引子，該檢測之敏感性主要歸功於三方面的因素：DNA 有效抽取純化、*Entamoeba* 原蟲具有極多份數（~200 copies）之 SSU-rRNA 基因及 PCR 反應之專一增殖。我們已有效率地直接從糞便檢體中抽取純化 DNA 並排除可能干擾 PCR 反應之物質，這一步驟未來極有潛力自動化成為臨床上可採用之「直接糞便檢體抽取 DNA 法」；*Entamoeba* 原蟲的 SSU-rRNA 基因主要落於其細胞內 episome plasmid 內，而 *Entamoeba* 原蟲的 episome 數目可達數百個，如是在裂解細胞、抽取 DNA 並去除干擾物質後，SSU-rDNA copy 數已是細胞數的數百倍；PCR 反應之條件經最適化後可以再有效地增殖 *Entamoeba* 原蟲專一之基因片段，本分子檢測系統可以有效地鑑別診斷痢疾阿米巴原蟲，對於未來協助臨床診斷、治療及防治工作暨重建阿米巴痢疾之流行病學資料及有助益，類似之分子檢測方法亦有被他人開發出來 [Evangelopoulos *et al.* 2000]，唯其敏感度遜於本法百倍以上。但是現行分子檢測還不是一般醫學檢驗室人員可以操作，鏡檢或是 ELISA 等試劑仍需扮演初步篩檢之工具，分子檢測可作為最後鑑別確認的手段 [Haque *et al.* 1998]，未來仍有賴自動化各步驟以減少人手操作（hands-on），分子檢測方能作為檢驗方法。另一方面，仍應積極研究開發可做鑑別診斷的 ELISA 等檢驗試劑作為普遍適用的檢驗法。

## 結論與建議

阿米巴痢疾在台灣地區為法定傳染病，本國高危險群為群居之精神療養院或智障教養院，其中混有致病與非致病性者，現行做法只要鏡檢確認，隨後投藥治療進行防治工作，如有過度用藥並找錯防治對象的問題。在外勞境外移入病例方面，現今採取的政策為鏡檢確認即逕行遣返，造成外勞及雇主極大損失。1997年後，舉世漸漸接受致病與非致病性痢疾阿米巴應先區分再治療的概念，但是一般的檢驗方法並無法作此鑑別診斷。本研究針對此積極研發適用的鑑別方法，此分子檢測法可用於參考實驗是作為最後確認之工具，我們仍將請已授權之衛生醫療機關利用鏡檢作初步篩檢，結果應填寫為「疑似痢疾阿米巴；*Entamoeba histolytica/dispar*」，爾後重新採集新鮮糞便檢體送疾病管制局本實驗是做最後鑑別確認。

## 參考文獻

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-402.
- Anonymous (1997) "WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis." *Epi. Bull. PAHO* **18**, 27-30.
- Bhattacharya, A., Satish, S., Bagchi, A., and Bhattacharya, S. (2000) "The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* **30**, 401-410.
- Bhattacharya, S., Som, I., and Bhattacharya, A. (1998) "The ribosomal DNA plasmids of *Entamoeba*. *Parasitol. Today* **4**, 181-185.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., van der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**:495-503.
- Clark, C. G. (1998) "Amoebic disease: *Entamoeba dispar*, an organism reborn." *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**, 361-364
- Diamond, L. S., and Clark, C. G. (1993) "A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925." *J. Euk. Microbiol.*, **40**, 340-344.
- Diamond, L. S., Harlow, D. R., Cunnick, C. C. (1978) "A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*." *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**, 431-432.
- Evangelopoulos, A., Spanakos, G., Patsoula, E., Vakalis, N., and Legakis, N. (2000) "A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces." *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **94**, 233-240.
- Haque, R., Ali, I. K. M., Akther, A., and Petri, W. A. (1998) "Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection." *J. Clin. Microbiol.* **36**, 449-452.
- Huston, C. D., Haque, R., and Petri, W. A. (1999) "Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection." *Expert Rev. Mol. Med.*

(99)00059-9a.pdf, (<http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk>)

- Sargeant, P. G., Williams, J. E., and Grene, J. D. (1978) “The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis.” *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**, 519-521
- Strachan, W. D., Spice, W. M., Chiodini, P. L., Moody, A. H., and Ackers, J. P. (1988) “Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*.” *Lancet*, **I**, 561-563.
- Tannich, E., Horstmann, R. D., Knobloch, J., and Arnold, H. H. (1989) “Genetic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5118-5122.
- Tannich, E. (1998) “*Entamoeba histolytica* and *E. dispar*: comparison of molecules considered important for host tissue destruction.” *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**, 593-596.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., and Higuchi, R. (1991) “Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material” *BioTechniques* **10**, 506-513.



	10	20	30	40	50	60
<i>E.histolytica</i>	TATCTGGTTG	ATCCTGCCAG	TATTATATGC	TGATGTTAA	GATTAAGCCA	TGCATGTGTA
<i>E.dispar</i>	TATCTGGTTG	ATCCTGCCAG	TATTATATGC	TGATGTTAA	GATTAAGCCA	TGCATGTGTA
	70	80	90	100	110	120
<i>E.histolytica</i>	AGTATAAAGA	CCAAGTAGGA	TGAAACTGCG	GACGGCTCAT	TATAACAGTA	ATAGTTTCTT
<i>E.dispar</i>	AGTATAAAGA	CCAAGTAGGA	TGAAACTGCG	GACGGCTCAT	TATAACAGTA	ATAGTTTCTT
	130	140	150	160	170	180
<i>E.histolytica</i>	TGGTTAGTAA	AATACAAGGA	TAGCTTTGTG	AATGATAAAG	ATAATACTTG	AGACGATCCA
<i>E.dispar</i>	TGGTTAGTAA	AATACAAGGA	TAGCTTTGTG	AATGATAAAG	ATAATACTTG	AGACGATCCA
	190	200	210	220	230	240
<i>E.histolytica</i>	GTTTGTATTA	GTACAAA	ATG GCCAATT	CAT TCAATG	AAT TGAGAAATGA	CATTCTAAGT
<i>E.dispar</i>	ATTTGTATTA	GTACAAA	CTG GCCAATT	TAT CTAATG	AAT TGAGAAATGA	CATTCTAAGT
	250	260	270	280	290	300
<i>E.histolytica</i>	GAGTTAGGAT	GCCACGACAA	TTGTAGAACA	CACAGTGTTT	AACAAGTAAC	CAATGAGAAT
<i>E.dispar</i>	GAGTTAGGAT	GCCACGACAA	TTGTAGAACA	CACAGTGTTT	AACAAGTAAC	CAATGAGAAT
	310	320	330	340	350	360
<i>E.histolytica</i>	TTCTGATCTA	TCAATCAGTT	GGTAGTATCG	AGGACTACCA	AGATTATAAC	GGATAACGAG
<i>E.dispar</i>	TTCTGATCTA	TCAATCAGTT	GGTAGTATCG	AGGACTACCA	AGATTATAAC	GGATAACGAG
	370	380	390	400	410	420
<i>E.histolytica</i>	GAATTGGGGT	TCGACATCGG	AGAGGGAGCT	TTACAGATGG	CTACCACTTC	TAAGGAAGGC
<i>E.dispar</i>	GAATTGGGGT	TCGACATCGG	AGAGGGAGCT	TTACAGATGG	CTACCACTTC	TAAGGAAGGC
	430	440	450	460	470	480
<i>E.histolytica</i>	AGCAGGCGCG	TAAATTACCC	ACTTTCGAAT	TGAAGAGGTA	GTGACGACAC	ATAACTCTAG
<i>E.dispar</i>	AGCAGGCGCG	TAAATTACCC	ACTTTCGAAT	TGAAGAGGTA	GTGACGACAC	ATAACTCTAG
	490	500	510	520	530	540
<i>E.histolytica</i>	AGTTGAGTAA	AATCAATTCT	TGAAGGAATG	AGTAGGAGGT	AAATTCTCCT	ACGAAATCAA
<i>E.dispar</i>	AGTTGAGTAA	AATCAATTCT	TGAAGGAATG	AGTAGGAGGT	AAATTCTCCT	ACGAAATCAA
	550	560	570	580	590	600
<i>E.histolytica</i>	TTGGAGGGCA	AGTCTGGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATTCCA	GCTCCAATAG	TGTATATTAA
<i>E.dispar</i>	TTGGAGGGCA	AGTCTGGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATTCCA	GCTCCAATAG	TGTATATTAA

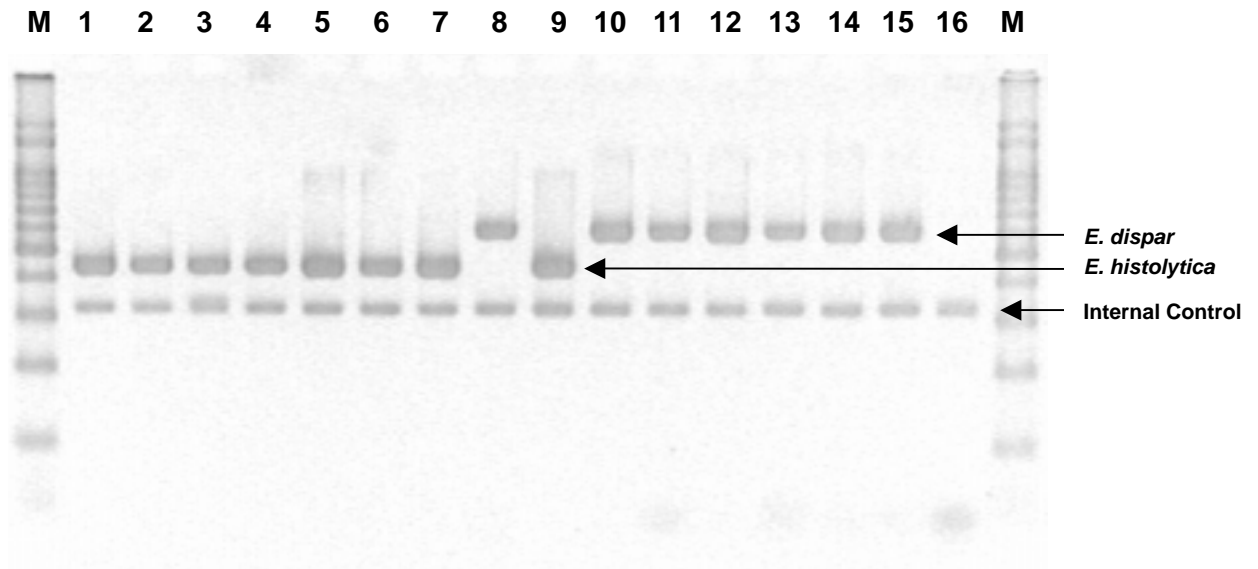
	610	620	630	640	650	660		
<i>E.histolytica</i>	AGTTGCTGTG	ATTAAAACGC	TCGTAGTTGA	ATTAAAATGT	GCTTTTATAC	ATTTTGAAGA		
<i>E.dispar</i>	AGTTGCTGTG	ATTAAAACGC	TCGTAGTTGA	ATTAAAATGT	GCTTTTATAC	ATTTTGAAGA		
	670	680	690	700	710	720		
<i>E.histolytica</i>	CTTTAFCGTAA	GTAAAGTTTC	TAGAAATGTT	AAATTAAAAT	CAAAGAAGGA	AACAAITCAA		
<i>E.dispar</i>	CTTTANNNTAA	GTAAAGTTTC	TAGAAATGTT	AAATTAAAAT	CAAAGAAGGA	CAANNITCAA		
	730	740	750	760	770	780		
<i>E.histolytica</i>	GTAATTGAGT	TGTTATTACT	TTGAATAAAA	TAAGGTGTTT	AAAGCAAAAC	ATTATGTTAA		
<i>E.dispar</i>	GTAATTGAGT	TGTTATTACT	TTGAATAAAA	TAAGGTGTTT	AAAGCAAAAC	ATTATGTTAA		
	790	800	810	820	830	840		
<i>E.histolytica</i>	TGAATATTC	AGCATGGGAC	AATGCTGAGG	GGATGTCAAT	AAGACATTTC	GAGAGAAGGA		
<i>E.dispar</i>	TGAATATTC	AGCATGGGAC	AATGCTGAGG	GGATGTCAAT	AAGACATTTC	GAGAGAAGGA		
	850	860	870	880	890	900		
<i>E.histolytica</i>	TTAAAAGGAA	CAATTGGGGT	GATTCAGAAA	ATAACGGGAG	AGGTGAAAAT	CCATGATCGC		
<i>E.dispar</i>	TTAAAAGGAA	CAATTGGGGT	GATTCAGAAA	ATAACGGGAG	AGGTGAAAAT	CCATGATCGG		
	910	920	930	940	950	960		
<i>E.histolytica</i>	TATAAGATGC	ACGAGAGCGA	AAGCATTTC	CTCAACTG	TCCATTAATC	AAGAACGAAA		
<i>E.dispar</i>	TATAAGATGC	ACGAGAGCGA	AAGCATTTC	CTCAACTG	TCCATTAATC	AAGAACGAAA		
	970	980	990	1000	1010	1020		
<i>E.histolytica</i>	GTTAGGGGAT	CGAAGACGAT	CAGATACCGT	CGTAGTCCTA	ACTATAAACG	ATGTCAACCA		
<i>E.dispar</i>	GTTAGGGGAT	CGAAGACGAT	CAGATACCGT	CGTAGTCCTA	ACTATAAACG	ATGTCAACCA		
	1030	<b>Outer1</b>	1040	1050	1060	<b>EH1</b>	1070	1080
<i>E.histolytica</i>	AGGATTGGAT	<u>GAAATTCAGA</u>	<u>TGTACAAAGA</u>	TAGAGAA	CA	TTGTTTCTAG	ATCTGAGTAT	
<i>E.dispar</i>	AGGATTGGAT	<u>GAAATTCAGA</u>	<u>TGTACAAAGA</u>	TGAAGAA	CA	TTGTTTCTAA	ATCCAAGTAT	
						<b>ED1</b>		
	1090	1100	1110	1120	1130	1140		
<i>E.histolytica</i>	ATCAATA	CTTGTTCAG	AACTTAAAGA	GAAATCTTGA	GTTTATGGAC	TTCAGGGGGA		
<i>E.dispar</i>	ATCAATA	CTTGTTCAG	AACTTAAAGA	GAAATCTTGA	GTTTATGGAC	TTCAGGGGGA		
	1150	1160	1170	1180	1190	1200		
<i>E.histolytica</i>	GTATGGTCAC	AAGGCTGAAA	CTTAAAGGAA	TTGACGGAAG	GGCACACCAG	GAGTGGAGCC		
<i>E.dispar</i>	GTATGGTCAC	AAGGCTGAAA	CTTAAAGGAA	TTGACGGAAG	GGCACACCAG	GAGTGGAGCC		

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
<i>E.histolytica</i>	TGCGGCTTAA	TTTGACTCAA	CACGGGAAAA	CTTACCAAGA	CCGAACAGTA	GAAGGAATGA
<i>E.dispar</i>	TGCGGCTTAA	TTTGACTCAA	CACGGGAAAA	CTTACCAAGA	CCGAACAGTA	GAAGGAATGA
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
<i>E.histolytica</i>	CAGATTAAGA	GTTCTTTCAT	GATTTATTGG	GTAGTGGTGC	ATGGCCGTTT	TTAGTTGGTG
<i>E.dispar</i>	CAGATTAAGA	GTTCTTTCAT	GATTTATTGG	GTAGTGGTGC	ATGGCCGTTT	TTAGTTGGTG
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
<i>E.histolytica</i>	GAGTGATTG	TCAGGTTAAT	TCCGGTAACG	AACGAGACTG	AAACCTATTA	ATTAGTTTTC
<i>E.dispar</i>	GAGTGATTG	TCAGGTTAAT	TCCGGTAACG	AACGAGACTG	AAACCTATTA	ATTAGTTTTC
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
<i>E.histolytica</i>	TGCCTATAAG	ACAGAAATGT	TCGCAAGAAC	AGGTGCGTAA	GTACCACTTC	TAAAGGGAC
<i>E.dispar</i>	TGCCTATAAG	ACAGAAATGT	TCGCAAGAAC	AGGTGCGTAA	GTACCACTTC	TAAAGGGAC
	1450	1460	1470	1480	<b>EH2</b> 1490	1500
<i>E.histolytica</i>	ACATTTCAAT	TGTCCTATTT	TAATTG□TAG	TTATCTAATT	TCG□TTAGAC	CTCTTTTAAAC
<i>E.dispar</i>	ACATTTCAAT	TGTCCTATTT	TAATTG□TAG	TTATCTAATT	TCG□ATTAGAA	CTCTTTTAAAC
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
<i>E.histolytica</i>	GTGGGAAAAA	GAAAAAGGAA	GCATTCAGCA	ATAACAGGTC	TGTGATGCC	TTAGACATCT
<i>E.dispar</i>	GTGGGAAAAA	GAAAAAGGAA	GCATTCAGCA	ATAACAGGTC	TGTGATGCC	TTAGACATCT
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
<i>E.histolytica</i>	TGGGCCGCAC	GCGCGCTACA	ATGGAGTTAC	TAGAGAG□AT	TTTATCATTT	ACACCTTATT
<i>E.dispar</i>	TGGGCCGCAC	GCGCGCTACA	ATGGAGTTAC	TAGAGAG□AT	TTTATCATTT	ACACCTTATT
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
<i>E.histolytica</i>	TATTAGGCT□	TGTCTAATA□	TTA□GGATAG	TAAGTGGTGT	ACCGAGATTG	AAATAGTTAA
<i>E.dispar</i>	TATTAGGCT□	TGTCTAATA□	GTAGGGATAG	TAAGTGGTGT	ACCGAGATTG	AAATAGTTAA
				<b>ED2</b>		
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
<i>E.histolytica</i>	GGAAAACCTCA	AAAGAACGTA	CATGACAGGG	ATAAATGATT	GGAATTATTT	GTTTTGAACG
<i>E.dispar</i>	GGAAAACCTCA	AAAGAACGTA	CATGACAGGG	ATAAATGATT	GGAATTATTT	GTTTTGAACG
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
<i>E.histolytica</i>	AGGAATTCCT	TGTAATATCG	AGTCATTAAC	TCGAGATGAA	TACGTCCTG	CCCTTTGTAC
<i>E.dispar</i>	AGGAATTCCT	TGTAATATCG	AGTCATTAAC	TCGAGATGAA	TACGTCCTG	CCCTTTGTAC

	1810	1820	1830	1840	1850	1860
<i>E.histolytica</i>	ACACCGCCCG	TCGCTCCTAC	CGATTGAATA	AAGAGGTGAA	<u>ATTCTAGGAT</u>	<u>TCTGTCTTAT</u>
<i>E.dispar</i>	ACACCGCCCG	TCGCTCCTAC	CGATTGAATA	AAGAGGTGAA	<u>ATTCTAGGAT</u>	<u>TCTGTCTTAT</u>
					<b>Outer1R</b>	
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
<i>E.histolytica</i>	AGATAGAAAA	ATGGATTTAA	ATCTCCTTAT	TTAGAGGAAG	GAGAAGTCGT	AACAAGGTTT
<i>E.dispar</i>	AGATAGAAAA	ATGGATTTAA	ATCTCCTTAT	TTAGAGGAAG	GAGAAGTCGT	AACAAGGTTT
	1930	1940				
<i>E.histolytica</i>	CCGTAGGTGA	ACCTGCGGAA	GGATCATT			
<i>E.dispar</i>	CCGTAGGTGA	ACCTGCGGAA	GGATCATT			

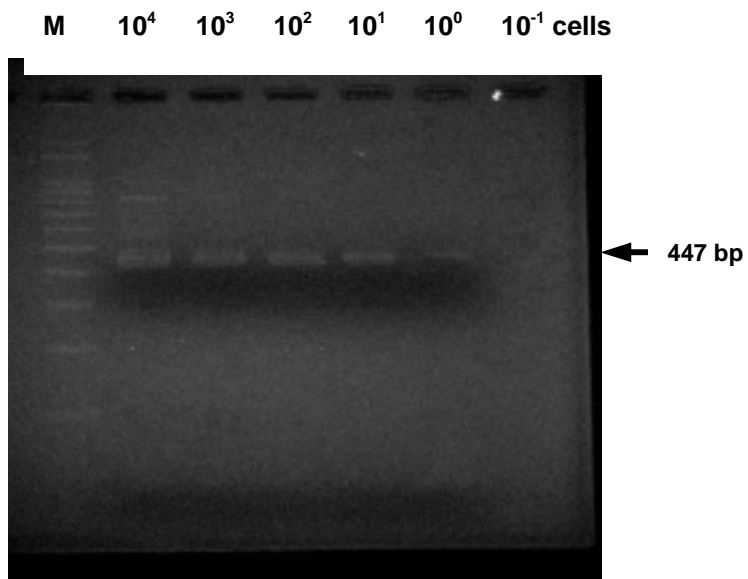
圖一、 *E. histolytica* 和 *E. dispar* 的 SSU-rDNA 序列比對及阿米巴種別鑑定 PCR 之引子相對位置圖





圖二、阿米巴種別鑑定 PCR 產物之 3% 洋菜膠電泳圖

跑道M是100 bp Marker;跑道1-7及9分別是*E. histolytica* SSU-rDNA之447 bp之基因片段, 及*E. coli*之uidA基因320 bp基因片段;跑道8及10-15分別是*E. dispar* SSU-rDNA之603 bp之基因片段, 及*E. coli*之uidA基因320 bp基因片段;跑道16是陰性糞便對照, 只有*E. coli*之uidA基因320 bp基因片段。



圖三、致病性痢疾阿米巴 (*E.histolytica*) PCR 產物之 3% 洋菜膠電泳圖；M 是 100 bp Marker 跑道；其餘跑道分別是不同的數目之 *E.histolytica* cells 經 PCR 反應後所呈現之產物訊號。

## 表

表一、阿米巴種別鑑定 PCR 所用引子之序列

Category	Primer pairs (forward+reverse)	PCR product size
Primers for <i>Entamoeba</i> spp. SSU-rDNA		
1 <sup>st</sup> PCR	Outer1: 5'- GAA ATT CAG ATG TAC AAA GA -3'	823 bp
	Outer1R : 5'- CAG AAT CCT AGA ATT TCA C -3'	
Primers for <i>Entamoeba histolytica/dispar</i> differentiation		
2 <sup>nd</sup> PCR	EH1 : 5'- AAG CAT TGT TTC TAG ATC TG -3'	447 bp
	EH2 : 5'- CAC GTT AAA AGA GGT CTA AC -3'	
	ED1 : 5'- AAA CAT TGT TTC TAA ATC CA -3'	603 bp
	ED2 : 5'- ACC ACT TAC TAT CCC TAC C -3'	
Primers for <i>E. coli</i> uidA gene		
Internal control	UidA1 : 5' – AGA TAT TCG TAA TTA TGT GG - 3'	320 bp
	UidA2 : 5' – AGA AAT CAT GGA AGT AAG AC - 3'	



