استنبات الأميبا الحالّة للنسج (*Entamoeba histolytica*) في الزجاج و تشخيص النمو البكتيري في الوسط الزرعي

*زهراء عبد الرحيم أحمد عبد الله * آمنة نصيف جاسم* علي حسين أدحية***

تاريخ قبول النشر 4 /12 / 2008

الخلاصة

تم عزل و تنميته وأدامة نموالاميبا الحالة للنسج في الزجاج باستخدام الوسطين الزرعيين Locke-egg medium (LEM) و Liver infusion Agar medium (LIAM). أديم المستنبت لمدة 21 شهراً وكان أفضل وقت لأدامة الطفيلي هو كل 48 ساعة، علماً بأن نمو الطفيلي في الوسطين الزرعيين أستمر لمدة 13 يوم وبدون أدامة . كما تجدر الاشارة هنا الى عدم تكون أكياس خلال فترة أستنبات الطفيلي في الوسطين الزرعيين ، وبالرغم من ذلك لوحظ تكون أكياس فتية في وسط LEM وذلك عند التأخر في ادامة المستنبت . وعند تشخيص النمو البكتيري في الوسطين الزرعين فأن بكتريا Escherichia coli هي السائدة وان وجودها يشكل مطلباً أساسياً لنجاح استنبات طفيلي الأميبا الحالّة للنسج في الوسطين الزرعيين.

الكلمات المفتاحية : أستنبات ، الاميبا الحالة للنسج ، إيشكريشيا القولون

المقدمة :

تظهر الأميبا الحالّة للنسج (*Entamoeba histolytica*) خلال دورة حياتها بثلاثة أشكال مميزة مظهرياً ، وهي الشكل المتحرك وهو الطور المتغذي (Trophozoite) والشكل ما قبل التكيس (Precyst) والشكل المتكيس (Cyst) وهو الطور المعدي (Infective stage) [1]. تتوطن الأطوار المتغذية في الأمعاء الغليظة للإنسان ، إذ لها القابلية على إحداث التحلل الخلوي (Cytolysis) وتحلل الأنسجة(Histolysis) وذلك بإفراز مواد سامة وانزيمية تحلل وتحطم الطبقة المخاطية للأمعاء ثم تتغذى على الأنسجة المتحللة وكريات الدم الحمر والبكتريا الطبيعية (Bacterial flora) في الأمعاء[2] . يحدث الخمج بالأميبا الحالّة للنسج نتيجة امتلاك الطفيلي لعوامل الفوعة، وقد يساعد في ذلك وجود بعض البكتريا السالبة لملون غرام (Gram-negative bacteria) [3].

طورت عدة أنواع من الأوساط الزرعية ثنائية الطور لتشمل المصول والأكار أو خلاصة البيض في الوسط المائل. توجد ثلاثة أنواع أساسية للأنظمة الزرعية وهي : Xenic (نمو الطفيلي بوجود جراثيم معوية طبيعية وغير محددة) و Monoxenic (نمو الطفيلي بوجود نوع واحد فقط من البكتريا المضافة) وAxenic (نمو طفيلي بغياب أي نمو جرثومي أو خلوي آخر) [4].

لذا أجريت هذه الدراسة بهدف تنمية الطفيلي في الاوساط الزرعية ولاطول فترة ممكنة ومعرفة نوع وتأثير النمو البكتيري المرافق للنمو الاميبي.

المواد وطرائق العمل

جمع وعزل الطفيلي من عينة البراز

Collection and Isolation of parasite from stool samples

جمعت عينات البراز من أشخاص بالغين يعانون من الإسهال وغير خاضعين للعلاج والمراجعين لمستشفى اليرموك التعليمي . وتم التأكد من خمجهم بطفيلي الأميبا الحالّة للنسج من خلال الفحص المجهري للبراز وتشخيص طوري الطفيلي المتغذي والمتكيس بطريقة التحضير الرطب (Wet preparation) [5] .

عزلت الأميبا الحالة للنسج من عينة البراز بأخذ 1غم من العينة وخصوصاً المنطقة الحاوية على الدم أو المخاط لاحتمال كثرة وجود الطفيلي فيها، ثم مزجت العينة بشكل جيد بوساطة ماصة باستور مع 3 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي والى أن أصبح المزيج مستحلباً، ثم مرر من خلال طبقة من الشاش المعقم أو بوضعه في أنبوبة اختبار معقمة بشكل مائل لمدة نصف ساعة لغرض إزالة الدقائق الكبيرة من المستحلب قبل إضافته الى الوسط الزرعي [6,4] وبعد عزل الأميبا من البراز أضيف حجم معين (0.5 مل) من المستحلب الى أنابيب الوسط الزرعي ثم حضنت أنابيب الأوساط الزرعية بوضع عمودي في الحاضنة بحرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة[7,4] ، وأستند طيلة مدة البحث على سلالة أميبية عزلت من فتى بعمر 16عام وتم التأكد من خمجهُ بالأميبا الحالّة للنسج، وكان البراز ذو قوام إسهالي مخاطي مع وجود قليل من الدم.

*قسم علوم الحياة/ كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
** وحدة الأبحاث البايولوجية للمناطق الحارة /كلية العلوم /جامعة بغداد

تحضير الأوساط الزرعية Culture Media

حضرت نوعين من الأوساط الزرعية من نوع Xenic culture media لتنمية الأميبا الحالّة للنسج، وهذه الأوساط ذات بيئة ثنائية الطور (Diphasic media) .

أ- الوسط الزرعي (LE)

Locke- egg (LE) medium

حضر الوسط الزرعي والذي يتكون من طورين بحسب طريقة (Boeck and Drobohlav,1925)

1. الطور الصلب : المكون الأساسي لهذا الطور هو محتوى بيض الدجاج بمقدار 5 مل والذي يمثل السطح الصلب المائل.

2. الطور السائل : محتوى هذا الطور هو محلول لوكس (Locke's solution) و يمثل الطور السائل العلوي إذ أضيف بمقدار 6 مل الى الطور الصلب المائل في انبوبة الزرع [4] .

ب- الوسط الزرعي نقيع الكبد مع الأكار Liver infusion agar medium

حضر الوسط بحسب طريقة (Cleveland and Collier,1930) ويتكون ايضاً من طورين :

1. الطور الصلب : المكون الأساسي لهذا الطور هو نقيع كبد البقر(Beef liver infusion) بمقدار 5 مل والذي يمثل السطح الصلب المائل.

2. الطور السائل: يتألف هذا الطور من دارئ المحلول الفسيولوجي والمصل المعقم لدم الخروف بعد تثبيط المتمم ، إذ مزجا بنسبة 1:5 . تم أضافةهذا المزيج (6 مل) والذي يمثل الطور السائل الى الطور الصلب[7].

المضادات الحيوية Antibiotics

أضيفت كل من Streptomycin Sulphate بمقدار 2ملغم/مل و Procaine Benzylpenicillin بمقدار 1000 وحدة دولية/مل و Nystatin بمقدار 2 ملغم/مل الى الطور السائل للوسط الزرعي للسيطرة على نمو البكتريا ولمنع نمو الفطريات لكي تساعد على تجهيز السلالة الأميبية في الزرع [7,4]

متابعة مراحل نمو طفيلي الأميبا الحالّة للنسج في الوسطين الزرعيين

تم متابعة نمو الطفيلي في كلا الوسطين الزرعيين المستخدمين وذلك بتلقيح 0.08×10^6 طور متغذي / مل من الطور السائل للوسط الزرعي الى أنابيب الزرع الحاوية على الأوساط الزرعية ثم حضنت بحرارة 37 مْ ، وقد تم تحديد كمية العالق الحاوي على الاطوار المتغذية للطفيلي والمضافة للاوساط الزرعية بواسطة شريحة عد الخلايا Haemocytometer وباستخدام المعادلة التالية وحسب ماجاء في[8] :

العدد الكلي للاميبا (أميبا/مل) = مجموع أعداد الأميبا في المربعات × عامل التخفيف $\times10^4$

وبدأ الفحص بعد اليوم الأول (24 ساعة) للحضن وذلك برج أو قلب أنبوبة الزرع وبهدوء ليصبح عالقاً ثم أخذت قطرة من العالق ووضعت على شريحة العّد وتم عد الخلايا مع استبعاد الخلايا التي تلونت بالتريبان الزرقاء، بعد ذلك أعيدت أنبوبة الزرع الى الحاضنة وبدون أي نقل للمستنبت وفحصت مرة أخرى في اليوم الثاني وبنفس الطريقة، واستمرت العملية لغاية انتهاء النمو بشكل نهائي في الأوساط الزرعية.

تشخيص النمو البكتيري في الوسطين الزرعيين

أخذت مسحة من كلا الوسطين الزرعيين (بوجود المضادات الحيوية المضافة الى الوسطين الزرعيين) وزرعت على أربعة أنواع من الأوساط الزرعية الخاصة بالأحياء المجهرية وهي , Blood, MacConky agar , Chocolate Sabourauds agar agar ، ثم حضنت بحرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة ، بعد ذلك لوحظ وجود مستعمرات وردية اللون في وسط MacConky agar ، إضافة الى وجود نمو ضعيف في وسط Chocolate agar و Blood agar في حين لم يلحظ أي نمو في وسط Sabourauds agar ، بعد ذلك أجري اختبار الفحص المجهري بملون غرام والاختبارات الكيموحيوية والمتمثلة باختبار الأندول Indol test والتي تم أجراءها في مختبرات مستشفى اليرموك التعليمي وأظهر وجود نوع واحد من البكتريا السالبة لملون غرام.

النتائج :

سجل الوسطين الزرعيين كفاءة ونجاح متماثلين في عزل الأميبا من البراز وكانت نسبة نمو ونشاط الأميبا متقاربة في كلا الوسطين الزرعيين بعد 48 ساعة حضانة من العزلة الأولى، وبعد نقل المزروع لأكثر من 5-6 مرات تم الحصول على أفضل نمو تعدادي للأميبا لكلا الوسطين الزرعيين، كذلك لوحظ في حالة فشل تنمية الأميبا فقد كان ذلك متماثلاً في كلا الوسطين الزرعيين . وبعد نجاح تنمية الأميبا الحالة للنسج في الوسطين الزرعيين تم إدامة المستنبت للوسطين كل 48 ساعة، إذ لوحظ بأن أفضل نقل للمستنبت Xenic هو 48-72 ساعة وذلك بعد إضافة نشا الرز (مصدر للكاربوهيدرات) والمضادات الحيوية، إذ لوحظ أن معدل التضاعف يصل الى أعلى مستوى في هذه الأوقات، وقد تم إدامة تنمية هذه السلالة الأميبية لأكثر من سنة (21 شهر).

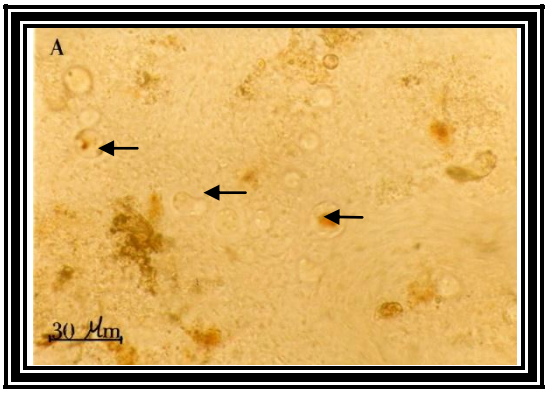
إن المضادات الحيوية التي تم إضافتها هي Benzylpenicillin Procaine التي تثبط البكتريا الموجبة لملون غرام وكذلك Streptomycin Sulphate إضافة الى Nystatin المثبط للنمو الفطري، إذ لوحظ تحسس أميبي عالي للنمو الفطري والتي أدت في بعض العينات الى موت الأميبا في الأوساط الزرعية بسبب النمو الفطري، كذلك الحال بالنسبة لإدامة المستنبت إذ لوحظ أن التأخر في إدامة المستنبت يؤدي الى هلاك الأميبا في كلا الوسطين الزرعيين وبنفس الوقت.

أن تشخيص الأميبا الحالّة للنسج يعتمد على وجود أطوار مراحل حياتها المختلفة وخاصة الطورين المتغذي والمتكيس وهذا ما يلاحظ عادة في البراز ألا أنه بعد تنمية الأميبا الحالّة للنسج في الوسطين الزرعيين وفحصه بعد 48 ساعة الأولى للتنمية لوحظ وجود الأطوار المتغذية فقط ولا وجود للأكياس أو لعملية التكيس، ورغم ذلك لوحظ تكونها في وسط LEM وذلك عند التأخر في إدامة المستنبت لأكثر من خمسة أيام، أذ تكوّنت أكياس فتية(Young cysts) بداية لتشكل الكيس حاوية على فجوة كلايكوجينية كبيرة والنواة جانبية الموقع، وكانت قليلة العدد لا تتجاوز الثلاثة، في حين لم تشاهد إطلاقاً أطوار متكيسة رباعية النواة.

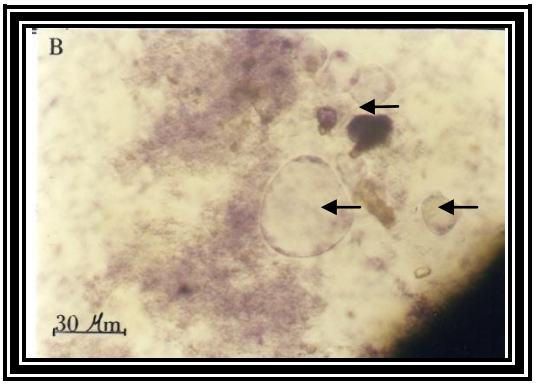
أظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين معدل التضاعف للوسطين الزرعيين عند مستوى احتمالية ≤ 0.001 ، أذ بلغ معدل التضاعف في وسط LEM 0.905×10^6 /مل بينما بلغ في وسط LIAM 0.386×10^6 /مل . إضافة الى معدل التضاعف فقد لوحظ وجود اختلاف بين حجم الطفيلي لكلا الوسطين الزرعيين، ففي وسط LIAM امتازت الأميبا بكبر حجمها (12-15-50 مايكرون) مقارنة مع وسط LEM (12-25 مايكرون) (شكل 1 و 2) ، إضافة الى قلة أعداد الأميبا في وسط LIAM مقارنة بوسط LEM على الرغم من أن كلا الوسطين الزرعيين يحويان نفس السلالة المرضية المعزولة من براز المخمج .

إضافة الى النمو الأميبي الحاصل في الوسط الزرعي لوحظ وجود نمو بكتيري في الوسطين الزرعيين الى جانب النمو الأميبي (شكل 3) ولذلك فقد أخذت مسحة من الوسطين الزرعيين وزرعت على أربع أنواع من الأوساط الزرعية الخاصة بالأحياء المجهرية ، وعند إجراء اختبار الفحص المجهري بملون غرام اضافة الى الاختبارات الكيموحيوية أظهر وجود نوع واحد من البكتريا السالبة لملون غرام وهي *Escherichia coli* ، ولوحظ وجودها بشكل متماثل في كلا الوسطين الزرعيين الخاصة بالنمو الأميبي وهكذا جهز الوسطين الزرعيين بالنمو البكتيري وبشكل تلقائي من عينة البراز المزروعة، وتم إضعاف هذه البكتريا المعزولة مع الاميبا من البراز بأضافة المضادات الحيوية طوال مدة الاستنبات.

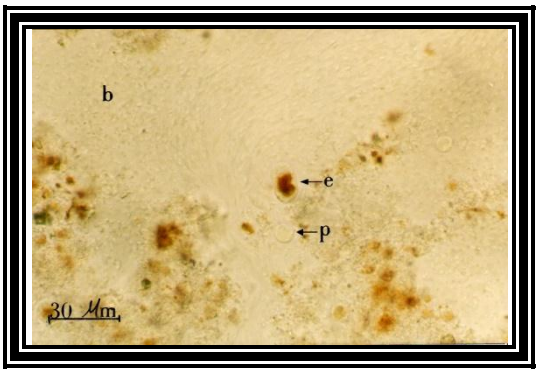
تبين من النتائج الآنفة الذكر وجود فروق معنوية في معدل التضاعف بين الوسطين الزرعيين المستخدمين، ولذلك فقد تم قياس مراحل نمو الأطوار المتغذية للأميبا الحالة للنسج من بداية التلقيح ولغاية هلاك الأميبا بشكل نهائي و لكلا الوسطين الزرعيين، ولقد أظهرت النتائج اختلاف في معدل التضاعف للأميبا في كلا الوسطين الزرعيين طيلة مدة المتابعة إذ لوحظ ارتفاع معدل النمو في وسط وانخفاضه في وسط زرعي آخر إلا انه في الساعة 48 (اليوم الثاني) حضانة بعد التلقيح لوحظ ارتفاع معدل النمو في كلا الوسطين الزرعيين وبعد ذلك في 72 ساعة (اليوم الثالث) للحضانة، لوحظ استقرار النمو في وسط LIAM وارتفاعه في وسط LEM واستمرت متابعة النمو وملاحظة التباين في الوسطين الزرعيين إذ لوحظ تدهور النمو بعد 72 ساعة (اليوم الثالث) في وسط LEM بينما في وسط LIAM كان تدهور النمو بعد 96 ساعة (اليوم الرابع)، واستمر تدهور النمو لغاية اليوم الثالث عشر حضانة بعد التلقيح إذ لوحظ هلاك كامل للأميبا الحالة للنسج في كلا الوسطين الزرعيين وبنفس الوقت وبشكل متماثل (شكل 4). كما لوحظ في وسط LEM ظهور حالة تكيس فتية حاوية على فجوة كلايكوجينية، إضافة الى انخفاض معدل الانقسام مع الوقت وتلون الأميبا بملون التريبان الزرقاء وفقدانها لمحتوياتها الداخلية.



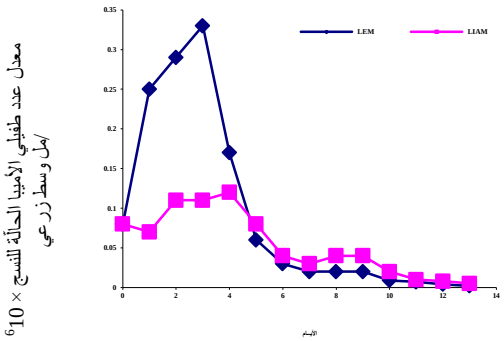
شكل (1): الأميبا الحالّة للنسج النامية في الوسط الزرعي LEM.



شكل (2): الأميبا الحالّة للنسج النامية في الوسط الزرعي LIAM (ملون لشمان).



شكل (3): المستنبت الأميبي في الزجاج توضح وجود البكتريا في الوسط الزرعي(b) ومبتلعة من قبل الأميبا (p) .



شكل (4) : متابعة نمو طفيلي الأميبا الحالّة للنسج على مدى 13 يوم في الوسطين الزرعيين المستخدمين

المناقشة :

بينت النتائج نجاح عزل الأميبا من البراز وتنميتها على الوسطين (LEM) و (LIAM) وهذا ما يؤكده [7] ، في حين أكد[9] بأن وسط LEM هو أحد الأوساط الذي يظهر دقة عالية في تشخيص الخمج بالأميبا الحالّة للنسج في البراز.

وبعد نجاح تنمية الأميبا الحاله للنسج في الوسطين الزرعيين تم إدامة المستنبت كل 48 ساعة وتم الحصول على أفضل تعداد أميبي بعد 5 الى 6 نقلات زرعية وهذا يتفق مع [9]، كما أظهرت الدراسة زيادة معدل تضاعف الأطوار المتغذية في 48-72 ساعة بعد التلقيح لكلا الوسطين الزرعيين وبعد ذلك بدأ بالانخفاض وهذا يتفق مع [9] إذ أكد بأن معدل التضاعف يصل الى اعلى مستوى له بعد 48 ساعة للتلقيح في جميع الأوساط الزرعية وكذلك أكدت عدد من البحوث بأن 72 ساعة حضانة تمثل الطور اللوغاريتمي والذي يتم فيه حصاد الأميبا [10,4] . وكذلك من الأمور الأساسية لوحظ فقط نمو الأطوار المتغذية في الوسطين الزرعيين وعدم وجود الأكياس أو حدوث التكيس وهذا ما أكده كل من [12,11]. وذكر [4]بأن الأكياس قد تحث في الأوساط Xenic وخاصة في وسط LEM وبشكل تلقائي وبأعداد صغيرة جداً وأن هنالك ثلاثة أمور أساسية للحصول على التكيس وهي الوسط الزرعي والبكتريا الطبيعية ونشا الرز وأن بعض الأوساط تكون أفضل من غيرها في هذا الغرض .

كما أظهرت الدراسة أيضاً بأن الأطوار المتغذية تنمو جنباً الى جنب مع البكتريا السالبة لملون غرام وهي *E. coli* وفي كلا الوسطين الزرعيين وبشكل متشابه وهذا يتفق مع عدة بحوث ، إذ ذكر [13] بأن الأطوار المتغذية وخاصة من سلالة HM1:IMSS الأكثر انتشاراً تتغذى بشكل واسع على بكتريا *E. coli*، أما [3] فأكدا على أن وجود البكتريا السالبة لملون غرام مع الأطوار المتغذية للأميبا من سلالة HM1:IMSS دور أساسي في زيادة عوامل الفوعة للأميبا وهذا ماأكده أيضا [14] ، كذلك أشارت عدة بحوث الى أهمية تجهيز الوسط الزرعي الأميبي بالبكتريا السالبة لملون غرام إذ لا يمكن أن تنمو الأميبا بغياب النمو البكتيري وأن البكتريا *E. coli* أكثر أنواع البكتريا الملائمة للنمو الأميبي في الأوساط الزرعية Xenic [7,4] ، وتستخدم المضادات الحيوية للسيطرة على النمو البكتيري ولا تمنع نمو البكتيريا الطبيعية في الإنسان باعتبار وجود هذه البكتريا ضرورياً لنجاح النمو الزرعي للأميبا ويجب حدوث حالة توازن بين البكتريا والأميبا وعادة تفضل سلالة واحدة من البكتريا وأن أكثرها شيوعاً هي *E. coli*، ويكون من الصعب نمو الأميبا في وسط زرعي بدون أن يجهز بكائنات مجهرية محددة ومسيطر عليها بالمضادات الحيوية[14]. وفي الدراسة الحالية فقد جهز الوسطين الزرعيين ببكتريا *E. coli* وبشكل تلقائي بسبب وجودها الطبيعي في براز المخمج.

وفيما يخص اكتساب الغذاء فقد أكد[15] بأن الأطوار المتغذية تحرر كمية كبيرة من أنزيمات Cysteine Proteinase في داخل

الأوساط الزرعية وهذه الأنزيمات مهمة لأجل اكتساب المواد الغذائية حتى من الطور السائل الحاوي على الأملاح، ولوحظ استهلاك الغذاء من الأوساط الزرعية بسرعة مما يؤدي الى هلاك الأميبا لذلك كانت الادامة كل 48-72 ساعة لتبديل المواد الغذائية للأوساط الزرعية. أما بالنسبة للمضادات الحيوية فقد أكدت الكثير من البحوث الى أهميةProcaine Benzylpenicillin و Streptomycin Sulphate في الأوساط الزرعية في تثبيط البكتريا الموجبة لملون غرام والسيطرة على نمو البكتريا السالبة لملون غرام إلا أنه لوحظ في بعض الحالات حدوث تلوث فطري أدى الى هلاك الأميبا في الوسط الزرعي وقد يعود السبب الى نفاذ المواد الغذائية بسرعة أو الى السموم الأيضية للفطريات ولذلك تم إضافة النستاتين الى الأوساط الزرعية تجنباً لحدوث التلوث الفطري، أما النمو البكتيري فقد أثبت أهميته في التفاعل المتبادل بين البكتريا و الأميبا إذ تقوم البكتريا بأخذ الأوكسجين المتواجد في الوسط الزرعي مما يناسب الأميبا التي تكون ذات معيشة لاهوائية، إضافة الى التفاعلات الأيضية للبكتريا التي قد تساهم في تجزئة المواد الغذائية في الوسط الزرعي.

ان توفر المواد الغذائية وأعداد الأميبا والبكتريا الملقوحة تؤثر على إطالة أو قصر مراحل النمو الأميبي، إذ أظهرت النتائج بأن معدل التضاعف يرتفع في كلا الوسطين الزرعيين في الساعة 48 من التلقيح وهذا ما أكده [9] إذ قام باختبار ثلاثة أوساط زرعية مختلفة من نوع Xenic لغاية أربعة أيام ولاحظ ارتفاع معدل التضاعف الى مستوى القمة في الساعة 48 بعد التلقيح بشكل متساوي لكل الأوساط الزرعية ثم بدأ بالهبوط، وذكر [7] بأن النمو يبدأ بطور التطبع(Lag phase) والذي يكون طويل نسبياً (12-24 ساعة) ويكون عدد الطفيليات النامية قليلاً خلال 6-12 ساعة الأولى ، بعد ذلك يأتي الطور اللوغارتمي (Logarithmic phase) وبعده طور الثبوت العددي (Stationary growth) ويسمى أيضاً بالنمو السلبي (Negative growth) ثم بعد ذلك يليه طور الموت السريع.

ويمكن تعليل سبب انخفاض النمو وتدرجه الى حالة الهلاك هو كثرة النواتج الأيضية والمواد السامة التي تنتجها الأميبا إضافة الى وجود البكتريا واستهلاك المواد الغذائية مما يؤدي الى هلاك الأميبا بشكل تدريجي، ولذا بينت النتائج بأن العالق الأميبي الملقوح والبالغ 0.08×10^6 طور متغذي /مل في وسط زرعي حاوي على5 مل طور صلب و6 مل طور سائل يمكنه من العيش بدون إدامة لمدة 13 يوم فقط.

References

1. Espinosa-Cantellano, M. and Martinez-Palomo, A. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis : From molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rev*., **15**:318-331.

2. Tanyuksel, M. and Petri, W.A. 2003. Laboratory Diagnosis of Amoebiasis. *Clin. Microbiol. Rev*., **16**:713-729.

3. Bracha, R. and Mirelman, D. 1984. Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. *J. Exp. Med*., **160**:353-368. [Abstract].

4. Clark, C.G. and Diamond, L.S. 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev*., **15**:329-341.

5. Tanyuksel, M.; Yilmaz, H.; Ulukanligil, M.; Araz, E.; Cicek, M.; Koru, O.; Tas, Z. and Petri, W.A. 2005. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amoebiasis. *Exp. Parasitol*., **110**:322-326.

6. Ramos, F.; Moran, P.; Gonzalez, E.; Garcia, G.; Ramiro, M.; Gomez, A.; Garcia de Leon, MC.; Melendro, E.I.; Valadez, A. .and Ximenez, C. 2005.*Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: Prevalence infection in aural mexican community. *Exp. parasitol*., **110**:327-330.

7. Taylor, A.E.R. and Baker, J.R. 1968. The cultivation of parasites *in vitro* . Black Well Science Publ., Oxford .pp.120-144.

8. Brousseau, P.; Payette, Y.; Tryphonas, H. Blakley, B.; Boermans, H.; Flipo, D. and Fournier, M 1999. Manual of immunological methods. CRC Press LIC, United State of America, Florida.pp7-135.

9. Dagci, H.; Balcioglu, C.; Ertabaklar, H.; Kurt, O. and Atambay, M. 2003. Effectiveness of peptone-

1983. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J. Exp. Med.* , **158**:1511-1521. [Abstract].

14. Mirelman, D. 1987. Amoeba-Bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol. Rev.*, **51**:272-284.

15. Que, X.and Reed, S.L. 2000. Cystine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev*., **13**:196-206.

16. Boeck,W.C.and robohlav,J. 1925 .The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Am.J.Hyg*.,**5**:371-407.Cited by Clark, C.G. and Diamond, L.S. 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev*., **15**:329-341.

17. Cleveland, L.R. and Collier, J. 1930.Various improvements in the cultivation of *Entamoeba histolytica* . *Am.J.Hyg*., **12**:606-613. Cited by Taylor, A.E.R. and Baker, J.R. 1968. The cultivation of parasites *in vitro* . Black Well Science Publ., Oxford .pp.120-144.

yeast extract (P-Y) medium in the cultivation and isolation of *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* in turkish patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **45**:127-130.

10. Mata-Cardenas,B.D.; Vargas-Villarreal,J.; Gonzalez- alazar, F. Martinez - Rodriguez,H.; orales-Vallarta, M. and Said-Fernandez,S. 2000.*Entamoeba histolytica* is unable to use freecholesterol,phospholipids, and fatty acids under axenic cultivation conditions. *Arch. Med. Res*., **31**:S212-S213.

11. Makioka, A.; Kumagai, M.; Ohtomo, H.; Kobayashi, S. and Takeuchi, T. 2001. Effect of calcium antagonists, calcium channel blockers and calmodulin inhibitors on the growth and encystations of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens* . *Parasitol.Res*., **87**:833-837.

12. Eichinger, D. 2001. Encystation in parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**:421-426.

13. Orozco, E.; Guarneros, G.; Martinez- Palomo, A. and Sanchez, T.

Cultivation of *Entamoeba histolytica in vitro* and diagnose the bacterial growths in culture media

Zahra'a Abdul-Raheem Ahmed* ***Amna N. Jasim ****

Ali H. Ad'hiah**

*Department of Biology, College of Science for Women, University of Baghdad

**Tropical-Biological Research Unit, College of Science, University of Baghdad.

Key word: Cultivation , ***Entamoeba histolytica , Escherichia coli***

Abstract:

The parasite was isolated from a stool sample, cultivated and maintained *in vitro* using Locke-egg medium (LEM) and Liver infusion agar medium (LIAM) . The culture was maintained for up to 21 months, and the best time to maintain the parasite was every 48 hours, although the growth in the culture media continued for 13 days without a maintenance. Additionally, no cyst formation was observed during cultivation of parasite in the two culture media. Although, was observe young cyst formed in LEM media were deletion of maintained. The diagnosis of bacteria growth in the culture media, bacterial content (*Escherichia coli*) was an dominance and essential requirement for a successful cultivation of *Entamoeba histolytica* in the two culture media.