التحري عن طفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica* عند الاطفال الرضع المصابين بالإسهال والراقدين في مستشفى الولادة والاطفال بالطرق الكلاسيكيةوتقنية تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة في الوقت الحقيقي RT – PCR.

تاريخ الاستلام 2015/2/5 تاريخ القبول 2015/4/26

خديجة عبيس حمود الخالدي/جامعة القادسية/ كلية العلوم

Khadeeja.abees@qu.edu.iq

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية الكشف عن طفيلي *Entamoeba histolytica* خلال المدة مابين شهر تموز حتى نهاية شهر كانون الاول 2014عند الاطفال الرضع المصابين بالإسهال والراقدين في مستشفى الولادة والاطفال في محافظة الديوانية، اذ بلغ عدد العينات المفحوصة 170 عينة خروج وللأعمار مابين شهر- سنتان، فحصت العينات بطريقة المسحة المباشرة باستعمال المحلول الملحي الفسيولوجي ومحلول اليود المائي فتم تسجيل 88 حالة اصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica* وبنسبة 51.76% كما لوحظ بأن اقل نسبة اصابة (36.17%) سجلت في الفئة العمرية1-6 شهور واعلى نسبة بلغت 61.76% عند الفئة العمرية1.6- سنتان في حين كانت نسبة الاصابة في الذكور والاناث متقاربة حيث بلغت 53.16% ،50.55% على التواليوبحسب نوع الرضاعة تبين بأن اعلى نسبة اصابة بلغت 59.79%سجلت عند الرضع ذوي الرضاعة الاصطناعية مقارنة بنسبة الاصابة 41.09% عند الرضع ذوي الرضاعة الطبيعية في حين بلغت نسبة الاصابة بالطفيلي 57.32% عند الرضع من سكنة المناطق الريفية وهي اعلى من نسبة الاصابة 46.59% المسجلة عند الرضع في مركز المدينة.

كما اظهرت النتائج بأن نسبة الاصابة بطفيلي*Entamoeba histolytica* بلغت 44.32% بواقع 39 عينه موجبه باستخدام تقنية تفاعل سلسلة انزيم البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي ككشف تأكيدي.

Biology Classification QR1 –74.5

الكلمات المفتاحية : تقنية تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي، طفيلي الاميبا الحالة للنسيج، الاسهال عند الرضع، الرضَع.

المقدمة Introduction

يعد طفيلي الزحار الاميبي *Entamoeba histolytica* من الطفيليات الوحيدة الخلية حقيقية النواة التي تسبب الكثير من الامراض للانسان بشكل واسع في العالم ، يطلق على هذا الطفيلي بالاميبا المسببة لداء المتحولات الاميبي للانسان Amoebiasis (WHO, 1995).

يصيب الطفيلي الامعاء الغليظة للإنسان مسبباً التقرحات العميقة في جدران الامعاء الى التهاب الغشاء البريتوني Peritonitis ثم الموت في حالة عدم العلاج(Green, 1997).

يعد طفيلي*E histolytica* واحداً من الطفيليات المسببةللإسهال بوجه خاص عند الاطفال وهو ذات انتشار عالمي تقريباً مع معدلات انتشار مرتفعة خاصة في الدول النامية، ويمكن ان يعرف الاسهال بأنه الزيادة الكبيرة في كمية وليونة البراز وقد ينتج الاسهال اما نتيجة الغذاء او قد يكون مصاحباً لبعض الادوية او قد يكون مصاحباً للأمراض العامة مثل التهاب اللوزتين والاذن الوسطى والتهاب المجاري البولية او نتيجة للإصابة بالمسببات المرضية المختلفة كالطفيليات (Caccio *et al*., 2003) مثل *Entamoeba histolytica* و *Giardia lamblia*و *Cryptosporidium* و *Isospora belli* و *Strongyloides stercoralis* و *Trichuris trichura* والبكتريا مثل *Salmonella spp* و *Shigella spp* و *Campylobacter jejunis* و *Clostridium difficile*اضافة الى المسببات الفطرية مثل *Candida albicans* (Heyneman,2001 ;Chaudhury *et al*.,1996).

بشكل عام يعتمد انتشار الامراض الطفيلية على تفاعل العوامل في اطار الثالوث الوبائي الكلاسيكي المكون من العائل والعامل المسبب والبيئة (منظمة الصحة العالمية، 1980).

نظراً لما لمرض الاسهال عند الاطفال الرضع من اهمية صحية ، جاءت هذه الدراسة التي هدفت الى تسليط الضوء على مدى انتشار الاصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica* لدى الاطفال الرضع (شهر- سنتان) المراجعينالى مستشفى الولادة والاطفال في مدينة الديوانية ومعرفة مدى تأثير الجنس ، العمر ، نوع الرضاعة ، منطقة السكن على نسبة الاصابة بهذا الطفيلي وتعد هذه الدراسة الاولى من نوعها في محافظة القادسية للكشف عن طفيلي الاميبا الحالة للنسيج في الاطفال الرضع باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1- جمع العينات Samples collection

تم جمع 170 عينه براز من الرضع الراقدين (الذين يعانون من اسهال) في مستشفى الولادة والاطفال في محافظة الديوانية وللفترة من شهر تموز وحتى نهاية كانون الاول 2014 وقد تم تنظيم استمارة استبيان خاصه بكل مريض تضمنت اسم المريض، عمره ، جنسه ،نوع الرضاعة، منطقة السكن .

وضعت العينات في حاويات بلاستيكية نظيفة ومعقمه ومزوده بأغطية محكمه لمنع جفاف العينة، جلبت العينات الى مختبرات كلية العلوم/ جامعة القادسية وفحصت بأسرع وقت ممكن لان تأخير العينات يؤدي الى اختفاء الاطوار المتغذية وخاصة في حالات الزحار الحاد فيصعب عندئذ تميزها (Swash, 1997)، بعد الانتهاء من الفحص العياني والمجهري حفظت عينات البراز في درجة حرارة 20- م لحين إجراء الفحص الجزيئي عليها.

2- فحص العينات Samples examination

فحصت العينات بعدة طرق منها:

أ- الفحص العياني Macroscopic examination

فحصت عينات البراز عيانياً Grossly قبل فحصه مجهرياً وشمل هذا الفحص قوام البرازConsistency ، لونه Color، شكله Form، كميته Quantity (Turgeon & Fritsche, 2001).

ب- الفحص المجهري Microscopic examination

تم استخدام طريقة المسحة المباشرة Direct smear method وتتضمن وضع قطرة من المحلول الملحي الفسيولوجي (0.9%) على الشريحة الزجاجية وقطرة اخرى من محلول اليود المائي Lugol's Iodine وقد اخذت العينات من اماكن مختلفة من النموذج لزيادة احتمالية ظهور الطفيلي فيما اذا كان موجوداً (WHO 1991,) ثم فحصت الشريحة تحت المجهر الضوئي باستعمال قوتي التكبير الصغرى والكبرى.

ت- الفحص باستخدام تقنية تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة في الوقت الحقيقي RT – PCR.

1-استخلاص الحمض النووي Stool DNA extraction

استخرجت عينات البراز المجمدة وتركت في درجة حرارة الغرفة لحين اذابتهاثم استخلص الحمض النووي من العينات وذلك باستخدام عدة الـ Stool Genomic (DNA extraction kit) المجهزة من شركة Bioneer الكورية, وتم أجراء الاستخلاص حسب تعليمات الشركة المجهزة.

3- بادئات ومجسات التشخيص Primers and Probes

استخدمت البادئات والمجسات الخاصة بجين (18S rRNA) المسؤول عن تشخيص طفيلي *Entamoebahistolytica* في عينات براز الرضع باستخدام تقنية الـ Real-Time PCRوحسب تسلسلها النيكلوتيدي الذي ورد في (Zulhainan *et al*., 2006)وقد تم تجهيز البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية.

الجدول (3-1): يمثل البادئات التي استخدمت في هذا الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي .

1- *Entamoeba histolytica*

Primer	Sequence	
E.H-ssrRNA Primer	F	5¯ATGCACGAGAGCGAAAGCAT¯3
	R	5¯GATCTAGAAACAATGCTTCTCT¯3
E.H-ssrRNAProbe	FAM-CAGGAGTGGAGCCTGCGCTT-BHQ1	

E.histolytica gene for small subunit rRNA.

3- طريقة التشخيص باستخدام فحص Real-Time PCR

تم أجراء تقنية Real-Time PCRفي كلية الطب البيطري/ جامعة القادسية باستخدام البادئات والمجسات الخاصة بجين(18S rRNA) المسؤول عن تشخيص طفيلي *Entamoeba* من عينات براز الإنسان وذلك حسب طريقة(Lau, *et* al.2013) كما في الخطوات التالية:

3-1- تحضير مزيج Real-Time PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل Real-Time PCR باستخدام عدة الـAccuPower® Dualstar qPCR Master Mix المجهزه من قبل شركة الـBioneer الكورية وحسب تعليمات الشركةكما في الجدول الاتي:

PCR master mix	Volume
DNA template	5µL
Forward primer10pmol	1µL
Reverse primer10pmol	1µL
TaqMan probe10pmol	2µL
DEPC water	9µL
Total	**50µL**

بعد ذلك تم وضع مكونات مزيج تفاعل Real-Time PCR التي ذكرت في الجدول علاه في انابيب بيضاء معتمة حجم 0.2ml خاصة بجهاز الـReal-Time PCR ومن ثم ونقلت جميع الانابيب الى جهاز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge (Exispin) بسرعة 3000rpm لمدة ثلاثة دقائق وثم وضعت في جهاز Real-Time PCR .

3-2- حالات الدورات الحرارية Real-Time PCR Thermocycler conditions

تم تطبيق الدورات الحرارية لفحص الـ Real-Time PCR وذلك بالاعتماد على تعليمات عدة AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master Mixوكذلك من خلال حساب درجة الTm البادئات وذلك باستخدام جهاز الـ MiniOpticon Real-Time PCR system BioRad. USA كما في الشكل ادنى:

qPCR step	Temperature	Time	Repeat cycle
Initial Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	10 sec	45
Annealing\Extention Detection(scan)	58 °C	30 sec	

3-3- تحليل نتائج فحص الـReal-Time PCR

تم تحليل نتائج فحص ال Real-Time PCR وذلك من خلال منحى التضخم Amplification plot المعتمد على رقم خط جهد العتبة Throushold cycler number (CT) value حيث تكون العينة موجبة عندما تتجاوز خط العتبة .

3-4- التحليل الاحصائي Statistical analysis

تم تحليل البيانات باستعمال البرنامج الاحصائي (SPSS version 10.5 software) حيث استخدم اختبار مربع كاي X2-Square لتحديد الفروقات المعنوية تحت مستوى احتمالية P≤0.05 وحسب ماذكره Niazi (2001).

النتائج والمناقشة Results and Discussion

1- طريقة المسحة المباشرة Direct smear method

بعد فحص 170 عينة براز اخذت من الاطفال الرضع الذي تراوحت اعمارهم ما بين شهر-سنتان، تبينبأن نسبة الاصابة بطفيلي الزحار الاميبي *Entamoeba histolytica* بلغت 51.76%(88 عينه موجبه) وكما موضح في الجدول رقم (1) وهي اعلى من النسبة23.3% التي اشار اليها Abdel-Hassin(1994) في مدينة الكوت وكذلك اعلى من النسبة 31.8% التي سجلها AL-saadi(1994) في الكوفة واعلى من النسبة 28.9% التي وردت في دراسة الشعيبي (2000) واعلى من النسبة 28.7% التي ذكرها العكيلي (2006) في محافظة القادسية كما انها اعلى من النسبة 19.9% المسجلة في دراسة الموسوي وجماعته (2009)في محافظة كربلاء وكذلك اعلى مما سجله الجنابي والتكريتي (2012)في محافظة بغداد اذ سجلا نسبة بلغت 18.72%.

قد يعزى سبب ارتفاع نسبة الاصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica*الى دورة حياته المباشرة فهو ينتقل عن طريق تناول المواد الغذائية والمياه الملوثةبالأكياساالناضجة لهذا الطفيلي فضلاً عن تواجد الناقل الميكانيكي للطفيلي المتمثل بالحشرات ممايؤدي الى انتشاره وهذا ما أكده كل من Bouilla *etal.* (1992) وBraga *et al.*(1998).

وفيما يخص علاقة الاصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica* والفئة العمرية للرضع المصابين بالإسهال ، بينت النتائج في الجدول (1) ايضاً ان اعلى نسبه للإصابة بالطفيلي قد سجلت عند الفئة العمرية (1-سنتان) اذ بلغت 61.76% واقلها عند الفئة العمرية (1-6 شهور) حيث بلغت 36.17% واشارت نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروق معنوية في نسبة الاصابة بالطفيلي بين الفئات العمرية تحت مستوى احتمالية P≤0.05.

الجدول (1): يبين العلاقة بين العمر ونسبة انتشار طفيلي*Entamoeba histolytica*

الفئة العمرية	عدد العينات المفحوصة	العدد الموجب	% للإصابة	العدد السالب
1-6 شهور	47	17	36.17	35
7شهور- سنه	55	29	52.73	26
1.6- سنتان	68	42	61.76	26
المجموع	170	88	51.76	82

X^2المحسوبة =7.321 X^2 الجدولية =3.525

ان ارتفاع معدل الإصابة عند الاطفال الرضع ذوي الفئة العمرية الاخيرة قد يعود الى عدة اسباب منها ان الاطفال في هذا العمر يكونوا كثيري الحركة والنشاط وبإمكانهم التقاط الكثير من الاشياءووضعها في الفم والتي قد تكون ملوثه فضلاً عن بعض العادات السيئة عند الاطفال مثل وضع الاصابع في الفم وهذه جميعها عوامل تجعلهم اكث عرضه للإصابة بالطفيليات ومنها طفيلي *Entamoeba histolytica* .

اما سبب انخفاض نسبة الإصابة عند الفئة العمرية (شهر-6 شهور) قد يعود الى مناعة الرضع في هذه الفئه العمرية تكون بمستوى جيد تتمثل بإفراز الامينوكلوبين المناعي A الذي يمنع التصاق طفيلي *Entamoeba histolytica*ببطانة الامعاء وبالتالي منعه من التغذي ومن ثم موته وهذا ما أكده(Barbosa and Avila, 2004).

كما بينت نتائج الدراسة بأن لا توجد فروق معنوية بين اصابة الذكور والاناث تحت مستوى احتمالية $P\leq0.05$، اذ بلغت نسبة الإصابة عند الذكور 53.16% وعند الاناث 50.55% وقد يعود السبب في ذلك الى تماثل الظروف التي يتعرض لها الرضع من كلا الجنسين كما موضح في الجدول رقم (2).

الجدول (2): يبين العلاقة بين الجنس ونسبة انتشار طفيلي *Entamoeba histolytica* .

نوع الجنس	عدد العينات المفحوصة	العدد الموجب	% للإصابة	العدد السالب
ذكور	79	42	53.16	37
اناث	91	46	50.55	45
المجموع	170	88	51.76	82

X^2المحسوبة =5.016 X^2 الجدولية =5.035

يتضح من النتائج في الجدول (3) بأن نسبةالإصابة بطفيلي*Entamoeba histolytica*لدىالمصابين من سكنة المناطق الريفية كانت57.32% اعلى من نسبة الاصابة عند سكنة مركز المدينة والبالغة 46.59% ولكن الفروق كانت غير معنوية تحت مستوى احتمالية $P\leq0.05$، وقد يعود سبب ارتفاع نسبة الاصابة عند رضع الاقضية والنواحي الى كون الظروف الصحية هناك رديئة فضلاً عن قلة نظافة مياه الشرب او عدم توفرها وتدني المستوى التعليمي لا غلب الامهات هذه كلها عوامل تزيد من حالات الاصابة بالاسهال (Caccio *et al*., 2003).

الجدول (3): يبين العلاقة بين منطقة السكن ونسبة انتشار طفيلي *Entamoeba histolytica* .

موقع السكن	عدد العينات المفحوصة	العدد الموجب	% للإصابة	العدد السالب
ريف	82	47	57.32	35
مدينة	88	41	46.59	47
المجموع	170	88	51.76	82

X^2المحسوبة =1.956 X^2 الجدولية =1.55

وفيما يتعلق بنوع الرضاعة فقد اشارت النتائج في الجدول (4) الى ان اعلى نسبة اصابه بالطفيلي قد سجلت عند الرضع ذوي الرضاعة الاصطناعية وبلغت 59.79% مقارنة مع نسبة الإصابة عند الرضع ذوي الرضاعة الطبيعية اذ بلغت 41.09% اذ لوحظ وجود فروق معنوية بين نسبة انتشار الطفيلي ونوع الرضاعة وسبب ذلك يعود الى مايتمتع به ذوي الرضاعة الطبيعية من مناعة يكتسبها الرضع من الامهات هذا بالمقارنة مع ذوي الرضاعة الاصطناعية ومايرافقها من تلوث لزجاجات الحليب في حالة اهمال العنايةالمستمرة بها.

الجدول (4): يبين العلاقة بين نوع الرضاعة ونسبة انتشار طفيلي *Entamoeba histolytica* .

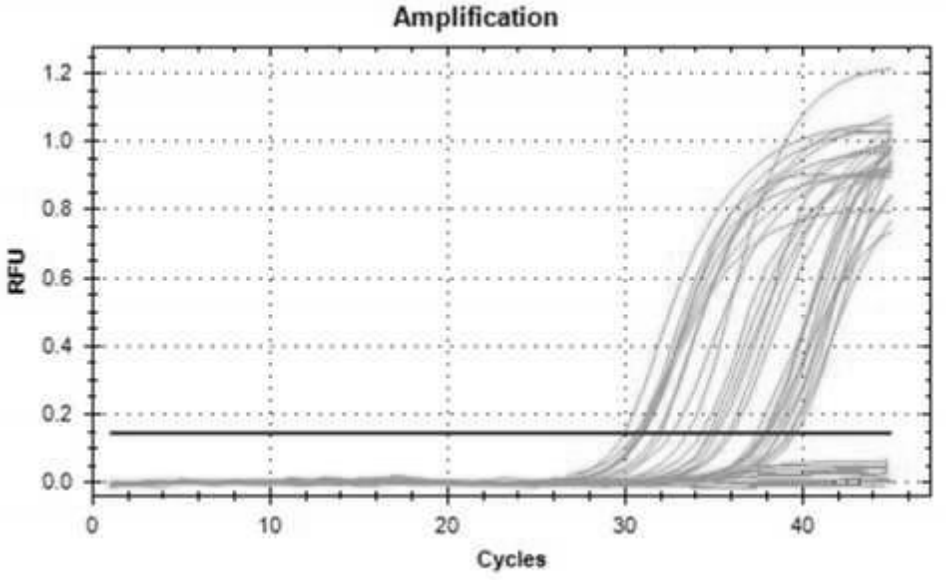
نوع الرضاعة	عدد العينات المفحوصة	العدد الموجب	% للإصابة	العدد السالب	%
اصطناعية	97	58	59.79	39	40.20
طبيعية	73	30	41.09	43	58.91
المجموع	170	88	51.76	82	48.24

X^2المحسوبة =5.832 X^2 الجدولية =5.107

2 - تقنية تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة في الوقت الحقيقي RT – PCR.

تعد تقنية تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي Real-time PCR ،طريقة مهمة ودقيقة في التشخيص المختبري للأمراض المعدية Infectious diseases وذلك بسبب لما تمتاز به هذه التقنية من مميزات مثل قصر الفترة الزمنية التي تستغرقها وامكانية السيطرة على التلوث المختبري الذي يرافق بقية الطرق المختبرية، بسبب كون طريقة عمل هذه التقنية تتم في نظام مغلق بعيد عن التلوث،فضلاً عن قلـــة كلفـــة المحاليـــل والكواشف المستخدمـــة فيها (Jelinek *et al*., 1996).

اشارت نتائج الدراسة الحالية باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي Real-time PCR ككشف تأكيدي للتحري عن الجين18S rRNA gene الخاص بطفيلي *E. histolytica*في 170 عينة براز الى وجود 39 عينة موجبة للتفاعل وبنسبة 44.32%وكما في الشكل(1) وهذه النسبة اقل من النسبة (51.76%) المسجلة في الدراسة الحالية باستخدام طريقة المسحة المباشرةقد يعود سبب ذلك الى انتشخيص الإصابة بطفيلي *E. histolytica*مجهرياً صعب نوعاً ما وذلك بسبب تشابه هذاالنوع مع الانواع الاخرى العائدة لنفس الجنس مثل *E.dispar*و*E.moshkovskii* لذلك يجب اعتماد طرق تشخيصية جزيئية أكثر حساسية وخصوصية (Fotedar *etal*.,2008)، لذا يمكن القول بأن تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي هو الأفضل والاكثر دقة في الكشف عن طفيليالاميبا الحالة للنسيج *E.histolytica* في عينات البراز، اذ تستطيع هذه التقنية من الكشف عن الكميات القليلة من الطفيلي فهي قادرةان تتحسس لـ 0.2- من طفيلي *E. histolytica* في غرام واحد من البراز(Zulhainan, 2010).



الشكل رقم (1): يوضح منحنى التضخم Amplification plot لعينات جين

18S rRNA gene الخاص بطفيلي *Entamoeba histolytica* في اختبار RT-PCR.

ان النسبة المسجلة في الدراسة الحالية اعلى من النسب32%، 2.94%، 12.5%المسجله من قبل كل من Przemyslaw *et al.*(2000) و(2003) Patrick & Louise و Zulhainan *et al.*(2010) باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي على التواليواقل من النسب 88%،86% التي اشار اليها كل من Blessmann (2002) *et al.* و Lau *et al.*(2013)باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي،في حين كانت النسبة مقاربة للنسبة التي ذكرها Liang *et al.*(2010) باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي، قد يعود سبب اختلاف نسب انتشار طفيلي *E.histolytica* في الدراسة الحالية والدراسات المذكورة اعلاه الى اختلاف حجم العينة واختلاف الظروف المختبرية ووقت الدراسة.

لمصادر

*المصادر العربية

التكريتي، الهام عائد اسعد، الجبوري، عبد الخالق علوان والتكريتي، علي حسينلطيف.(2008).انتشارطفيليالزحار الاميبي *E. histolytica*في بيجيوضواحيها وتأثير مستخلصات قشور الرمان *Punica granatum* في نموالطفيلي بالوسط الزرعي .كلية التربية .جامعة تكريت. العراق.8صفحة.

الدليمي، خديجة خليفه عبد الله.(2001). دراسة وبائية لطفيلي الزحار الاميبي وتأثيردرجات الحرارة والحموضة على حيوية اكياس الطفيلي. رسالة ماجستير. كليةالعلوم. جامعة الانبار.

الجبوري، عبد الله حسين عبد الله، التكريتي، الهام عائد اسعد، البياتي، شجعان رضا حسن. (2012). دراسة وبائية عن الاوالي المعوية في قضاء الطوز معدراسة التأثير النسيجي الممرض على امعاء الفئران المصابةالجياردیا. مجلة تكريتللعلوم الصرفة :17(3) . كلية التربية. جامعة تكريت.العراق.

الجنابي ، مروان عبد الهادي حسين والتكريتي، الهام عائد اسعد.(2012). انتشار الخمج بالاميبا الحالة للنسيج *E. histolytica* بين الاطفال المراجعينلمستشفى الطفل المركزي في مدينة بغداد .المجلة العراقية للعلوم:55(3).

العمر، نجاح صبحي نايف خطاب.(1992).دراسة حول مدى انتشار الطفيليات المعوية في بعض مناطقمحافظة نينوى وتأثيرها على مستوى الهيموكلوبينواعداد الحمضات. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الموصل.

الموسوي، ملاك ماجد، المسعودي، هادي رسول والاعرجي، علي شعلان.(2002).وبائية الطفيليات المعوية عند مرضى الاسهال في محافظة كربلاء. مجلة جامعة الكوفة للعلوم الصرفة والتطبيقية.

الاسدي، حيدر عبد الجليل راضي الهزام .(2007). دراسة في وبائية بعض الطفيليات المعوية المرضية واحيائية طفيلي الاميبا الحالة للنسيج *E. histolytica* في محافظة البصرة. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم. جامعة البصرة

*المصادر الاجنبية

Barbosa-Sabanero,G.; Avila, E.(2004).Recognition of *Entamoeba histolytica* IIs, KDA Surface protein by human secretory immunoglobulin from asymp- -tomatic carriers, J of Parasitology. Institute De Investidcion En Biologia Experimental Facultad De Quimica Unersida De Guanajuato ,Mexico PMID.

Blessmann, J.;Buss, NU.; Dinh, BT.; Ngo, QT.; Van, AL.; Alla, MD.; Jackson, TF.; Ravdin, JI.; Tannich, E.(2002).Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples.J Clin.Microb.40(12): 4413-7.

Bonilla, L., Para, A. M.; Estere, Z.J.; Morales, L. M. and Suraza, H. (1992). Prevalence of *E. histolytica* and other intestinal parasites in communityfrom Marcerbo Venezuela. Ann. Trop. Med. Parasitol., 86: 373-380.

Braga, L. L.; Mendonca, Y. Paiva, C. A.; Sales, A.; Cavalconte, A. L. and Mann,B. J.(1998). Seropositivity for and intestinal *Entamoeba histolytica* and *Entam-oeba dispar* colonization within individuals in North eastern Brazil.J. Clin. Microbiology. 3045-3044(10)36.

Chaudhury, A.; Nath, G.; Shukla, B.; Panda, S.& Singh, T.(1996).Diarrhea associated with *Candidaspp*.:Incidence a seasonal variation .J. Diarrheal Dis.Res.,14(2):110-112.

Coccia, S.M.,De Gracomo, M., Aulicinga, F. M. and Pozio, E. (2003). *Giardia* cysts in waste water treatment plants in Italy. Applied environmental Microbiology .Vol.69, pp.3393- 3398.

Jelinek, T., G. Peyerl, T. Löscher, and H.-D. Nothdurft.(1996). Evaluation of an antigen-capture enzyme immunoassay for detection of *Entamoeba histolytica* in stool samples. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15:752-755.

Lau,YL.; Anthony, C.; Fakhrurrazi, SA.;Ibrahim,J.;Ithoi , J.; Mahmud, R. (2013).Real-time PCR assay in differentiating *Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar,* and*Entamoeba moshkovskii*infections in Orang Asli settlements in Malaysia.Parasit Vectors 28;6(1):250.

Liang, SY.; Hsia, KT.; Chan, YH.; Fan,CK.; Jiang,DD.; Landt, Ji.(2010).Evaluation of a new single-tube multiprobe real-time PCR for diagnosis of *Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar*.J.Parasitol.96(4):793-7

Niazi, A.D.(2001).Statistical analysis in medical research. Nahrei .University.Republic of Iraq.

Patrick, G. and Louise ,T.(2003).Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispa*r Isolates in Clinical Samples by PCR and Enzyme-Linked immunosorbent Assay.J.Microb.41(1)237-241.

Przemyslaw, M.; Jozef,K.; Halina,P.;Andrzej,K.; Waclaw, N.and Beata,S.(2000) .Molecular Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from stool and culture samples obtained from polish Citizens infection in Tropics and in Poland. Acta Protozool.39:217-224.

Swash, M. (1997).Hutchison's clinical methods, 20th Ed., W. B. Saunders Co., Philad- -elphia:438 pp.

Turgeon, D.K. & Fritsche, T.R.(2001).Laboratory approaches toinfectiousdiarrhea. Gastroenterol. Clin. 30(3):7-22.

World Health Organization.(1995).Bridging the gaps .World Health forum.16:377-385.

World Health Organization. (2004).Cited by Global Health Council .(2005). Web master of Glob Health. Internet in 12:12.

Zulhainan,H.; Songsak, P.; Mathirut,M.; Saovanee,L.and Porntip,C.P.(2010).Development of Multiplex Real-Time polymeraseChain Reaction for Detection of *Entamoeba histolyticaEntamoeba dispar,* and *entamoeba moshkovskii*in Clinical specimens.Am.J.Trop.Med.Hyg.,909-913.

Detection of *Entamoeba histolytica* in patients an infected infants with diarrhea in born and children's hospital by classic methods and Real-timePolymerase Chain Reaction.

Receved :5/2/2015 Accepted :26/4/2014

Khadeeja Abees Hmood AL-Khalidi /AL-Qadisia university/Sciences college

Khadeeja.abees@qu.edu.iq

Abstract

The results of this study were including detection of *Entamoeba histolytica* in an in patients infected infants with diarrhea in born and children's hospital in Al-Diwania province during the period from June until December 2014, the number of samples was 170 stool sample for age between one month-two years, these samples were examined by direct smear method by using physiological normal saline and Iodine solution, there 88 samples were positive in percentage %51.76 also the lower percentage was %36.17 recorded in age 1-6 months and the higher percentage was %61.76 in age (1-6)-two years, wherever the percentage of an infected male was closely which reach %53.16 ,%50.55 respectively. According to type of feeding, the higher percentage was %59.79 in an infants with Artificial feeding compare with the percentage %41.09 in an infants with breast feeding, wherever the percentage of infection with parasite was %57.32 in rural region ,its higher than the percentage %59.46 in urban area, also the results were showed the percentage of infection with this parasite was %44.32 by using Real-time polymerase chain reaction as confirmative test .

Key word: Infants ,Diarrhea in infants ,*Entamoeba histolytica*,Real time-PCR.