Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 5 (November - December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Isolation and Identification of Acanthamoeba from Tonekabon Rivers Regional, Mazandaran

Shahin Mataji Bandpei, Mohammadreza Khataminejad

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2016/05/18
Accepted: 2016/07/24
Available online: 2016/10/17

Article Subject:
Medical Parasitology

IJMM 2016; 10(5): 60-66

Corresponding author at:

Mohammadreza Khatami Nejad

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Tel: 0989114594675

Email:
mr_khataminezhad@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Acanthamoeba species are abundant in soil and water samples and isolated from eye wash equipment sectors in medical laboratory. This single cell is as a cause of opportunistic infections, especially in patients with AIDS and organ recipients. The aim of this study was to isolate and identify the *Acanthamoeba spp*. from Tonekabon Rivers.

Materials and Methods: This study was a descriptive study. 100 samples were collected from the river in the Tonekabon city and were cultured on nutrient agar medium. Then Acanthamoeba to evaluate and identify common species identified using morphological and polymerase chain reaction (PCR) tests.

Results: 23 samples (23%) of the Acanthamoeba were identified morphologically and also using specific primers to amplify a 500 bp 18SrRNA. After sequencing, it was found that genotypes of Acanthamoeba, belongs to a new species, *Acanthamoeba palestinensis*.

Conclusions: The results show that *A. palestinensis* is one of the Amoebic keratitis risk factors in Tonekabon rivers. Health planners must take note and make people aware of the risk of contamination.

KeyWords: Amoeba, Amoebic keratitis, *Acanthamoeba palestinensis*, Tonekabon rivers, PCR

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Motajji Bandpei S, Khataminejad M. Isolation and Identification of Acanthamoeba from Tonekabon Rivers Regional, Mazandaran. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (5) :60-66

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۵ – آذر و دی ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی و شناسایی آکانتامبا از رودخانه‌های منطقه تنکابن، مازندران

شاهین متاجی بندپی، محمدرضا خاتمی نژاد

گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۲۹

پذیرش:۱۳۹۵/۰۷/۲۴

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۷/۲۶

موضوع:

انگل‌شناسی پزشکی

IJMM 1395; 10(5): 60-66

نویسنده مسئول:

محمدرضا خاتمی نژاد

گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۱۴۵۹۴۶۷۵

پست الکترونیک:

mr_khataminezhad@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: گونه‌های مختلف آمیب آکانتامبا به فراوانی در نمونه آب‌وخاک وجود دارند و در آزمایشگاه‌ها از بخش‌ها و تجهیزات شستشوی چشم جداسازی شده‌اند. این تک‌یاخته‌ها به‌عنوان عامل ایجاد عفونت‌های فرصت‌طلب، خصوصاً در بیماران مبتلابه ایدز و دریافت‌کنندگان اعضا مطرح می‌باشند. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی آمیب آکانتامبا از رودخانه‌های منطقه تنکابن می‌باشد.

مواد و روش کار: مطالعه حاضر یک مطالعه توصیفی است. در این پژوهش ۱۰۰ نمونه از آب رودخانه‌های شهرستان تنکابن جمع‌آوری و بعد از فیلتر نمودن، در محیط کشت آگار غیرمغذی کشت داده شدند. سپس آمیب‌های اکانتامبا با استفاده از بررسی مورفولوژی و رنگ‌آمیزی با تری کروم و واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) مورد ارزیابی و شناسایی قرار گرفتند. درنهایت با استفاده از انجام سکانس گونه شایع مشخص گردید.

یافته‌ها: ۲۳ نمونه (۲۳٪) ازلحاظ مورفولوژی آمیب آکانتامبا شناسایی شدند که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 18SrRNA با تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی تائید شدند. بعد از تعیین توالی، مشخص شد که ژنوتیپ آکانتامبا، متعلق به یک‌گونه جدید *آکانتامبا پالستینینزیز* (*Acanthamoeba palestinensis*) می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که گونه آکانتامبا پالستینینزیز که یکی از عوامل ابتلا به التهاب قرنیه آمیبی در ایران می‌باشد در آب‌های شهر تنکابن وجود دارد، لذا پزشکان و برنامه ریزان سلامت این منطقه به بیماری‌زایی این آمیب توجه داشته و مردم را از خطر به آلوده شدن آن آگاهی دهند.

کلمات کلیدی: آمیب، التهاب قرنیه، *آکانتامبا پالستینینزیز*، رودخانه‌های شهرستان تنکابن، PCR

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

آکانتامبا از آمیب‌های آزادزی است که انتشار جهانی دارد و در محیط آب‌وخاک وجود دارد. در زیستگاه‌های متعددی ازجمله آب دریا، ماسه‌های ساحل، فاضلاب، خاک‌های مناطق استوایی و قطب جنوب انتشار دارند. در محیط خانه از خاک گلدان، پساب‌ها، محیط بیمارستان، دستگاه‌های تهویه، حمام‌های آب‌درمانی و کولرها جداسازی شدند (۱). در آزمایشگاه‌ها، بخش‌ها و تجهیزات شستشوی چشم شناسایی شدند که برای افراد دچار آسیب قرنیه خطر ایجاد می‌کند. این تک‌یاخته‌ها در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی و نیز ایمنی سالم ایجاد عفونت‌های سیستم اعصاب مرکزی، کراتیت، سینوس، عفونت ریه‌ها و پوست می‌نماید. ممکن است طی ارزیابی هیستوپاتولوژیکی عادی، به دلیل عدم آشنایی با آمیب عفونت‌ها تشخیص داده نشوند (۲).

عارضه اصلی این آمیب در عفونت‌های چشمی، کراتیت آکانتامبایی است که به‌طور عمده در افراد جوان و دارای کفایت عملکرد ایمنی گزارش‌شده است و به‌طورمعمول در افرادی اتفاق می‌افتد که آسیب جزئی در قرنیه دارند یا از لنزهای تماسی به‌خصوص لنزهای آرایشی و رنگی استفاده می‌کنند. برخلاف عفونت‌های سیستمیک که با آکانتامبا ایجاد می‌شود، کراتیت آمیبی سبب درد، ضعف بینایی، حساسیت به نور می‌گردد (۲). چرخه زندگی آکانتامبا از دو مرحله تشکیل‌شده است، که یک مرحله تروفوزوئیت و یک مرحله کیست می‌باشد (۳). تروفوزوئیت ها دارای پاهای کاذب خاردار و سوزنی شکل و حرکت تروفوزوئیت کند و آهسته است (۴). کیست فاقد تقسیمات هسته‌ای است و تنها یک هسته با مشخصات هسته تروفوزوئیت

دارد. کیست‌ها در برابر مواد ضدعفونی‌کننده، خشکی و نور خورشید بسیار مقاوم هستند (۵). کیست‌ها می‌توانند حدوداً به مدت ۲۰ سال زندگی کنند (۶). شناسایی آکانتامبا به‌طورمعمول از طریق روش مستقیم میکروسکوپی نمونه‌ها یا کشت آن‌ها در محیط کشت و بر اساس خصوصیات ساختاری کیست‌های آن است. این روش به علت تأثیر شرایط کشت با محدودیت‌هایی همراه است. در سال‌های اخیر روش مولکولی واکنش زنجیره پلی مراز تا حد زیادی برطرف کرده و آزمون تأییدی مناسبی برای افتراق آکانتامبا از سایر آمیب‌های آزادزی است. PCR نمونه‌ها با تکثیر قطعه‌هایی از ژن 18SrRNA به‌عنوان روشی اختصاصی برای شناسایی جنس آکانتامبا توصیف‌شده است. با توجه به اینکه وفور و پراکندگی آمیب‌های آزادزی در طبیعت اهمیت زیادی در پیشگیری از بروز عفونت‌های فرصت‌طلب در افراد دارد و با توجه به اینکه هیچ اطلاع قبلی از تنوع آکانتامبا در رودخانه‌های شهرستان تنکابن وجود نداشت، این مطالعه باهدف جداسازی و شناسایی آکانتامبا در آب‌های رودخانه‌های شهر تنکابن انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به روش توصیفی انجام گرفت. تعداد ۱۰۰ نمونه آب از ۲۱ رودخانه پریشان (آب‌های ساکن و با حرکت کند) و خروشان (آب‌های جاری با سرعت زیاد) در ساعات ۷-۹، ۹-۱۱، ۱۲-۱۴ و از سطح آب در حاشیه رودخانه‌های دارای پوشش گیاهی به حجم ۱ الی ۵ لیتر به‌وسیله بطری‌های درپوش دار استریل، در فصل تابستان از رودخانه‌های شهرستان تنکابن جمع‌آوری گردید (۷). نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به کمک دستگاه پمپ خلأ و با فیلتر نیترو سلولزی ۰/۴۵ میکرون، فیلتر گردید (۸). نمونه‌های فیلتر شده در سرم فیزیولوژی شستشو داده شد سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سرم فیزیولوژی در مرکز پلیت حاوی محیط کشت آگار غیرمغذی و Pag,s Salin (pH:۷/۴- ۷/۲) که به آن سوسپانسیون باکتری *اشریشیاکلی* کشته‌شده اضافه‌شده بود کشت سفره‌ای داده شد. سپس در دمای ۲۵-۳۰ درجه سلسیوس به مدت یک تا دو هفته گرما گذاری شدند (۹).

برای حذف قارچ‌های موجود در محیط کشت، چندین بار مورد کشت مجدد قرار گرفتند. بدین‌صورت که در هر پلیت، نقطه‌ای که قارچ کمتر و تراکم FLA بیشتر وجود داشت را انتخاب و با تیغه اسکالپل استریل برش داده شد سپس در محیط جدید به‌صورت وارونه جاگذاری گردید. این عمل آن‌قدر ادامه داشت تا محیط بدون قارچ تهیه گردید (۹).

بعد از خالص‌سازی FLA در محیط کشت، به آن بافر فسفات سالین (PBS) اضافه شد و با تیغه اسکالپل استریل محیط برش داده شد تا کیست‌ها و تروفوزئیت ها در PBS شناور شوند. سپس بافر PBS در محیط را در درون میکروتیوب منتقل و با دور ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب باقی‌مانده چندین بار با PBS شستشو داده شد تا آگار موجود در رسوب کاملاً حذف گردد (۱۰, ۹). برای شناسایی آمیب‌ها، نمونه‌های جمع‌آوری‌شده با و بدون رنگ‌آمیزی تری کروم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 10X، 40X و 100X، بررسی و از تمام نمونه‌ها عکس گرفته شد. آمیب‌ها با توجه به ویژگی‌های مورفولوژی کیست‌ها و تروفوزوئیت مورد ارزیابی و شناسایی قرار گرفتند (۱۰).

جهت تائید ایزوله‌ها توسط کشت، پس از استخراج DNA ایزوله‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت ویوژن (Geno Plus™ Mini) با استفاده از پرایمر اختصاصی 18SrRNA (جدول ۱) واکنش PCR انجام گردید (۷).

جدول ۱: پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه جهت شناسایی جنس آکانتامبا

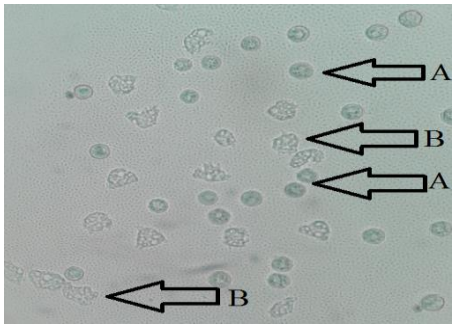
نام پرایمر	توالی	طول پرایمر (جفت باز)
Acant F	5′-GGCCCAGATCGTTTACCGTG-3	20
Acant R	5′-TCTCACAAGCTGGGGAGTCA-3′	20

واکنش PCR، روی DNA های نمونه‌های FLA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio Rad (My cycler) و در حجم کلی ۲۵ µL انجام گرفت. شرایط انجام واکنش شامل دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و همچنین گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. روی محصولات نهایی PCR پس از الکترفورز

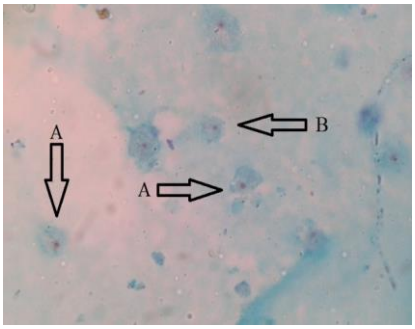
روی ژل اگاروز ۱/۵ درصد، سکانسینگ انجام شد و در مرحله بعد، سکانس‌های حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Blast با توالی‌های موجود در بانک ژنی مقایسه شدند.

یافته‌ها

بر اساس مشاهده مستقیم و گسترش تهیه‌شده رنگ‌آمیزی شده با تری کروم (شکل ۱ و ۲)، تعداد ۲۳ نمونه (۲۳٪) مثبت در ۷ رودخانه مشاهده و گزارش گردید. هم‌چنین نتایج PCR با محصول ۵۰۰ bp نتایج کشت و رنگ‌آمیزی را تائید کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که همه آمیب اکانتامبا ایزوله شده از آب‌های رودخانه‌های پریشان بودند (جدول ۲). نتایج بررسی جداسازی در زمان‌های مختلف نشان داد که در زمان‌های ۱۲-۱۴ بیشترین امکان ایزوله کردن این آمیب در آب‌ها مسیر می‌باشد (جدول ۳).



شکل ۱: کیست دایره‌ای با دیواره خارجی صاف و نازک و تروفوزوئیت خاردار و سوزنی شکل آکانتامبا در محیط آگار غیرمغذی حاوی *اشریشیاکلی* کشته‌شده A: کیست آکانتامبا B: تروفوزوئیت آکانتامبا



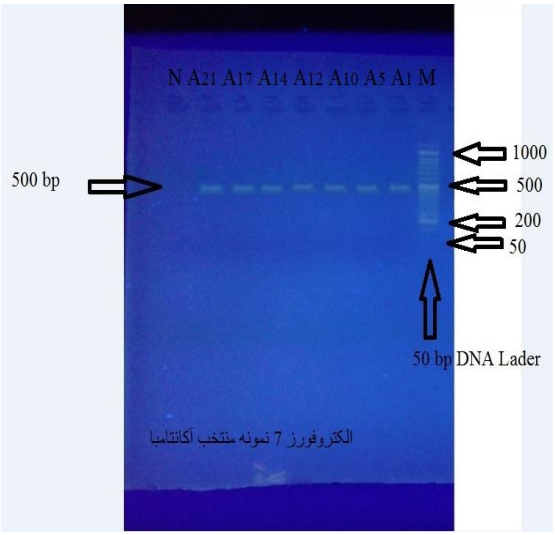
شکل ۲: کیست و تروفوزئیت آکانتامبا با رنگ‌آمیزی تری کروم و بزرگنمایی A 100X: تروفوزوئیت آکانتامبا B: کیست آکانتامبا

جدول ۲: فراوانی آکانتامبا بر اساس جریان آب

نوع رودخانه	تعداد نمونه	موارد مثبت (درصد)
پریشان	۶۱	۲۳ (۳۷/۷٪)
خروشان	۳۹	۰
تعداد کل	۱۰۰	۲۳ (۲۳٪)

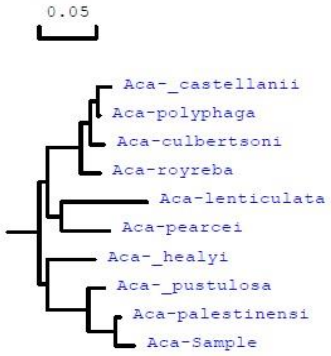
جدول ۳: فراوانی آکانتامبا بر اساس زمان نمونه‌گیری

ساعت نمونه‌گیری	تعداد نمونه‌گیری	موارد مثبت (درصد)
۹ - ۷	۲۱	۰
۱۱ - ۹	۲۷	۵ (۱۸/۵۲٪)
۱۴ - ۱۲	۵۲	۱۸ (۳۴/۶۲٪)
تعداد کل	۱۰۰	۲۳ (۲۳٪)



شکل ۳: مشاهده باند 500 bp آکانتامبا بر روی ژل آگارز M: لدر DNA Lader 50 bp، A: نمونه، N: کنترل منفی

نتایج حاصل از توالی ژن نشان داد، ژنوتیپ به‌دست‌آمده مربوط به *آکانتامبا پالستینزیز* ایزوله C21/FB2 بود. لازم به ذکر است که توالی ژنی در بانک ژنی NCBI به شماره ثبت ژنی GenBank KU364623.1 به نام *آکانتامبا پالستیننزیز* ایزوله متاجی (*Acanthamoeba Palestinensis strain Mataji*)، ثبت گردید.



شکل ۴: تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیک آکانتامبا بر اساس توالی 18SrRNA

بحث

بر اساس نتایج تحقیقات انجام‌شده، جمع‌آوری نمونه‌ها در فصل سرد از رسوبات کف رودخانه‌ها و دریاچه‌ها نتایج بهتری را دارند. در فصل زمستان به دلیل سرد بودن هوا این تک‌یاخته‌ها به‌صورت کیست درآمده و در کف جایگزین می‌شوند. با گرم شدن هوا کیست‌ها به تروفوزئیت تبدیل می‌گردند (۱۳-۱۱)، لذا این اشکال فعال که بسیار به اکسیژن نیازمندند ترجیحاً در سطح آب بیشتر موجودند. در تحقیقی که Rezaian و همکاران در اعماق مختلف دریاچه پریشان کازرون انجام دادند، مؤید این موضوع می‌باشد (۱۴). درنتیجه، در تحقیق حاضر که در فصل تابستان نمونه‌گیری انجام شد، نمونه‌ها را از سطح رودخانه‌ها برای بررسی انتخاب کرده که بر اساس نتایج به‌دست‌آمده با نتایج محققین دیگر همخوانی داشت. این تک‌یاخته‌ها، ترموفیل (گرمادوست) هستند و ترجیحاً در درجه حرارت بالا، از جمعیت بیشتری برخوردار می‌باشند. در ساعات گرم روز بین ۱۲ الی ۱۶ بعدازظهر که در اثر تابش نور خورشید آب سطح دریاچه گرم می‌گردد، احتمال یافتن این آمیب‌ها نیز افزایش می‌یابد (۱۵). در تحقیقاتی که Wellings در دریاچه فلوریدا انجام داده بود، توانست بیشترین سطح زمینی آمیب نگلریا را در ماه‌های گرم تابستان به‌خصوص در ساعات گرم به دست آورد (۱۶). Rezaian و همکاران به‌منظور بررسی وجود آمیب در ساعات مختلف نمونه‌گیری انجام دادند، درواقع بهترین جواب‌ها را در گرم‌ترین ساعات به دست آوردند (۱۴). به‌منظور بررسی این احتمال، در ساعات مختلف روز از صبح تا عصر در درجه حرارت سطحی آب تفاوت چشمگیری وجود دارد، نمونه‌گیری انجام گردید. بهترین نتیجه‌ها را در ساعات گرم روز در فصل تابستان، برای گروه آکانتامبا در ساعات ۹ الی ۱۱ صبح از ۲۷ نمونه ۵ مورد (۱۸/۵۲٪) و ۱۲ الی ۲ بعدازظهر از ۵۲ نمونه ۱۸ مورد (۳۴/۶۲٪) به‌منظور بررسی جدا گردید. این نشان‌دهنده آن است، نتیجه تحقیق حاضر با نتایج تحقیقات اخیر کاملاً همخوانی دارد. در اکثر بررسی‌های آمفی زوئیک، بیشتر در دریاچه‌ها یا استخرهای شنا و آب‌های آلوده به پساب دستگاه‌های صنعتی گزارش‌شده است. در آب‌های معمولی این آمیب‌ها کمتر گزارش‌شده است. آب‌ها با درجه حرارت بالا ممکن است به‌عنوان مخازن برای ادامه حیات و انتشار آن‌ها عمل کنند (۱۷, ۱۶). مناطقی که تروفوزئیت آکانتامبا جدا گردید، منطقه‌ای با پوشش گیاهی در حاشیه رودخانه‌های شیرود (۳۶,۸۴ ۵۰,۸۰)، شیلات (۳۶,۷۹ ۵۰,۹۰)، میاندوج محله (۳۶,۸۷ ۵۰۷۷)، سادات‌محله (۳۶,۸۹ ۵۰,۷۰)، چالکرود (۳۶,۸۷ ۵۰,۷۶)، نسارود (۱۹,۵۲ ۵۰,۴۵)، افشره (۳۶,۸۰ ۵۰,۸۴) بود. این نشان‌دهنده آن است، که تکثیر فراوانی و افزایش جمعیت این تک‌یاخته‌ها وابسته به زنجیره غذایی آب می‌باشد. هر چه این زنجیره غذایی به‌خصوص ازنظر فتوسنتز کننده‌های تک‌سلولی غنی‌تر باشد اکوسیستم حاصله برای جمعیت تک‌یاخته‌ها مناسب‌تر می‌باشد (۱۸, ۱۶, ۱۵).

در این بررسی همانند مطالعه Rezaian، Crary و Badirzadeh از نمونه‌هایی که از رودخانه‌های خروشان (قسمت جاری آب) گرفته‌شده بودند، تک‌یاخته‌ای ایزوله نشد و تمامی ایزوله مربوط به رودخانه‌های پریشان (قسمت ساکن آب) بود که این می‌تواند به این دلیل باشد که قسمت حواشی رودخانه‌ها گاهی به‌صورت مجموعه بسته درمی‌آیند و جریان بسیار ضعیف آب از روی آن‌ها عبور می‌نماید و از زنجیره غذایی کاملی برخوردار بوده و تک‌یاخته‌ها فرصت خوبی برای رشد و تکثیر پیدا می‌کند. از چشمه‌های گالیسیا در اسپانیا نیز مواردی از نگلریا و آکانتامبا جدا نمودند (۱۹, ۱۴, ۵).

در تحقیق حاضر که به‌منظور جداسازی و شناسایی FLA در رودخانه‌های منطقه تنکابن به روش کشت و بررسی میکروسکوپی بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک و بررسی مولکولی بر اساس ترادف ژن‌های 18SrRNA انجام گردید. از ۱۰۰ نمونه بررسی‌شده، ۲۳ مورد (۲۳٪) برای آمیب آکانتامبا مثبت گزارش گردید. بعد از بررسی‌های مولکولی نمونه‌های آلوده به آمیب، برای گروه آکانتامبا، *آکانتامبا پالستیننزیز* شناسایی شدند. در تحقیقاتی که Rezaian روی آب‌وخاک رودخانه‌ها و دریاچه پریشان کازرون انجام دادند، از مجموع ۳۵۴ نمونه به روش کشت و میکروسکوپی بررسی کردند که ۱۰ مورد آکانتامبا و ۳ مورد نگلریا گزارش کردند (۱۴). نتایج تحقیق اخیر نشان داد که درصد آلودگی آکانتامبا نسبت به نگلریا بیشتر است. همچنین این نتایج نسبت به تحقیق حاضر ازنظر درصد آلودگی به FLA کمتر بوده است. Ghadar-ghadr و همکاران طی تحقیقاتی بر روی منابع آب شیراز بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی توانستند، FLA جداسازی و شناسایی نمایند (۱۰). از مجموع ۱۲۰ نمونه بررسی‌شده، ۴۲ مورد (۳۵٪) مثبت بودند. از نمونه‌های آلوده به آمیب، ۳۱ مورد (۷۳/۸۱٪) به یک نوع آمیب و ۱۱ مورد (۲۶/۱۹٪) به ۲ نوع آمیب آلودگی داشتند. فراوانی گونه‌های آکانتامبا (۳۹ مورد) نسبت به نگلریا (۱۴ مورد) بیشتر بوده است. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در این تحقیق، بر روی آب‌های چاه، شبکه‌های

آب‌رسانی و مخزن بوده است (۱۰). چاه‌ها (۴۴/۴٪) از درصد آلودگی بیشتری نسبت به سایر منابع برخوردار بودند، ولی در تحقیق حاضر که بیشترین درصد آلودگی در رودخانه‌های پریشان بوده، این مؤید آن است که در مکان‌ها زنجیره غذایی کاملی برای این آمیب‌ها وجود دارد، اما تحقیقات قبلی درصد آلودگی بیشتری نسبت به تحقیق حاضر برخوردار است. Leiva و همکاران در Nicaragua، از ۲۰۱ نمونه بررسی‌شده ۴۳٪ مثبت بودند. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که در مناطق شهری و گرمسیری آلودگی به آکانتامبا ۲۱٪ و ۲٪ است (۲۰). نتایج این تحقیق نسبت به تحقیق حاضر از بالاتر بودن درصد آلودگی به FLA می‌باشد، اما درصد آلودگی به‌صورت جدا کمتر از تحقیق حاضر که درصد آلودگی آکانتامبا در رودخانه‌های پریشان ۳۷/۷٪ می‌باشد. Edagawa و همکاران در بررسی شیوع FLA در آب آشامیدنی که منبع تغذیه آن، آب رودخانه‌ها و تصفیه‌خانه آب واقع در اوزاکای ژاپن بود، ۶۸/۷٪ به گونه‌های آکانتامبا و نگلریا گزارش شد (۲۱). همچنین در بررسی مولکولی، گونه *آکانتامبا آسترونکسیز* نشان داد (۲۱). نتایج این تحقیق نسبت به تحقیق حاضر از درصد آلودگی بیشتری برخوردار است. گونه جداشده نتیجه حاضر *آکانتامبا پالستیننزیز* می‌باشد، که با تحقیق اخیر مشابه نیست.

با توجه به یافته‌های این تحقیق، گونه *آکانتامبا پالستیننزیز* که یکی از عوامل ابتلا به التهاب قرنیه آمیبی در ایران می‌باشد در آب‌های شهر تنکابن به‌خصوص آب‌های خروشان در ساعت هائی که اوج گرما وجود دارد یافت می‌شوند، لذا پزشکان و برنامه ریزان سلامت این منطقه به بیماری‌زایی این آمیب توجه داشته و مردم را از خطر به آلوده شدن آن در هنگام شنا آگاهی دهند.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته میکروب‌شناسی می‌باشد که با همکاری دانشگاه آزاد واحد تنکابن انجام گردید. از مسئولان بخش‌های میکروب‌شناسی و ژنتیک دانشگاه تنکابن قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Page FC. A new key to freshwater and soil gymnamoebae: with instructions for culture. Ambleside: Freshwater Biological Association; 1988.
2. Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin Microbiol Rev. 2002;15(3):342-54.
3. Sissons J, Alsam S, Jayasekera S, Kim KS, Stins M, Khan NA. Acanthamoeba induces cell-cycle arrest in host cells. J Med Microbiol. 2004;53(Pt 8):711-7.
4. Martinez AJ. Free-Living Amebas: Naegleria, Acanthamoeba and Balamuthia. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th ed. Galveston (TX)1996.
5. Badirzadeh A, Niyyati M, Babaei Z, Amini H, Badirzadeh H, Rezaeian M. Isolation of free-living amoebae from sarein hot springs in ardebil province, iran. Iran J Parasitol. 2011;6(2):1-8. [in persion]
6. Mazur T, Hadas E, Iwanicka I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of Acanthamoeba isolates. Trop Med Parasitol. 1995;46(2):106-8.
7. Coskun KA, Ozcelik S, Tutar L, Elaldi N, Tutar Y. Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. Biomed Res Int. 2013;2013:675145.
8. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. Parasite. 2015;22:10.
9. Salehi M. Acanthamoeba Strains genotypes prevalence in water Sources in Bojnurd City: Short Communication. Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2014;21(2):260-6. [in persion]
10. Ghadar-ghadr S, Solhjoo K, Norouz-nejad M, Rohi R, Zia-Jahromi S. Isolation and identification of free living amoeba (Naegleria and Acanthamoeba) in Shiraz water resources by morphological criteria. Pars of Jahrom University of Medical Sciences. 2012;10(3):33-42. [in persion]
11. Visvesvara GS, Jones DB, Robinson NM. Isolation, identification, and biological characterization of Acanthamoeba polyphaga from a human eye. Am J Trop Med Hyg. 1975;24(5):784-90.
12. Sawyer TK, Visvesvara GS, Harke BA. Pathogenic amoebas from brackish and ocean sediments, with a description of Acanthamoeba hatchetti, n. sp. Science. 1977;196(4296):1324-5.
13. Szenasi Z, Endo T, Yagita K, Nagy E. Isolation, identification and increasing importance of 'free-

living' amoebae causing human disease. J Med Microbiol. 1998;47(1):5-16.

14. Rezaian M, Bagheri F, Farnia S, Babai Z. Isolation of pathogenic amoeba (naegleria and acanthameoba) from water sourcesand margin soils of reveirs and lakes in kazerun. Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research. 2003;1(3):41-8. [in persion]
15. Kyle DE, Noblet GP. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. J Protozool. 1986;33(3):422-34.
16. Wellings FM, Amuso PT, Chang SL, Lewis AL. Isolation and identification of pathogenic Naegleria from Florida lakes. Appl Environ Microbiol. 1977;34(6):661-7.
17. Huizinga HW, McLaughlin GL. Thermal ecology of Naegleria fowleri from a power plant cooling reservoir. Appl Environ Microbiol. 1990;56(7):2200-5.
18. Baquero RA, Reyes-Batlle M, Nicola GG, Martin-Navarro CM, Lopez-Arencibia A, Guillermo Esteban J, et al. Presence of potentially pathogenic free-living amoebae strains from well water samples in Guinea-Bissau. Pathog Glob Health. 2014;108(4):206-11.
19. Crary MJ. Genetic Variability and its Relationship to Acanthamoeba Pathogenesis: The Ohio State University; 2012.
20. Leiva B, Clasdotter E, Linder E, Winiecka-Krusnell J. Free-living Acanthamoeba and Naegleria spp. amebae in water sources of Leon, Nicaragua. Rev Biol Trop. 2008;56(2):439-46.
21. Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Kusuhara Y, Karanis P. Isolation and genotyping of potentially pathogenic Acanthamoeba and Naegleria species from tap-water sources in Osaka, Japan. Parasitol Res. 2009;105(4):1109-17.