Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Isolation of Free-living amoeba and Molecular Characterization of *Acanthamoeba* From Stagnant Water, Kashan, Iran

Mohammad Hossein Golestani[1], Sima Rasti[1], Hossein Hooshyar[1], Mahdi Delavari[1], Seyed Gholam Abbas Mousavi[2], Leila Iranshahi[3]

1. Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
2. Department of Statistics and Public Health, Faculty of Health, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
3. Department of Public Health, Faculty of Health, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2018/01/03
Accepted: 2018/06/14
Available online: 2018/06/30

Article Subject: Clinical Para

IJMM 2018; 12(2): 125-132

Corresponding author:

Sima Rasti
Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
Tel: 031-55450021
Email:
Rasti_s@yahoo.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: *Acanthamoeba*, the causative agent of granulomatous amebic encephalitis (GAE), is among the most prevalent free-living amoebas (FLA) existing in water, soil and dust. This study was conducted to determine FLA and identify *Acanthamoeba* genotypes isolated from stagnant water in Kashan, Iran.

Materials and Methods: In this descriptive study, 138 stagnant water samples were collected from Kashan mosques and public parks. The samples were filtered (0.45µm) and cultured onto non-nutrient agar for the presence of FLA. *Acanthamoeba* spp. was identified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers, which amplified a 490 bp fragment. Among ten sequenced isolates of *Acanthamoeba*, different genotypes were determined by sequence analysis. The parameters such as pH, temperature, sampling season and related results were recorded and analyzed using SPSS16.

Results: The rate of FLA was 88.4 %, 59.4% of which were confirmed as *Acanthamoeba* spp. using PCR method. The rate of *Acanthamoeba* T4 and T2 genotypes were 80% and 20%, respectively. There was a significant relation between FLA rate and sampling season (P= 0.01). The highest rate of FLA and *Acanthamoeba* was observed at pH 7. There was no significant relationship between FLA and *Acanthamoeba spp*. with pH and temperature.

Conclusions: The rate of FLA and *Acanthamoeba* in stagnant water were high in Kashan. The dominant *Acanthamoeba* genotype (T4) is pathogen. Due to serious amoeba-induced complications, hygienic education is recommended to increase the public awareness on transmission and health/preventive measurements.

Keywords: Free-living amoeba, Acanthamoeba, Stagnant Water, Genotype

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Golestani M H, Rasti S, Hooshyar H, Delavari M, Mousavi G A, Iranshahi L. Isolation of Free-living amoeba and Molecular Characterization of *Acanthamoeba* From Stagnant Water, Kashan, Iran. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (2): 125-132

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۲ – خرداد-تیر ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی آمیب‌های آزادزی و شناسایی مولکولی *آکانتامبا* از آب‌های راکد کاشان

محمدحسین گلستانی[۱]، سیما راستی[۱]، حسین هوشیار[۱]، مهدی دلاوری[۱]، سید غلام عباس موسوی[۲]، لیلا ایرانشاهی[۳]

۱. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۲. گروه آمار و بهداشت، دانشکدهٔ بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۳. گروه بهداشت محیط، دانشکدهٔ بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۳

پذیرش:۱۳۹۷/۰۳/۲۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۴/۰۹

موضوع: انگل شناسی بالینی

IJMM1397;12(2): 125-132

نویسندهٔ مسئول:

سیما راستی

گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

تلفن: ۰۳۱-۵۵۴۱۱۱۲

پست الکترونیک:

Rasti_s@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: *آکانتامبا* شایع‌ترین آمیب آزادزی است که به‌وفور در آب، خاک و گردوغبار وجود دارد و عامل آنسفالیت گرانولوماتوز آمیبی است. مطالعهٔ حاضر برای تشخیص آمیب‌های آزادزی و شناسایی ژنوتایپ‌های *آکانتامبا* در آب‌های راکد شهر کاشان انجام شده است.

مواد و روش کار: در این مطالعهٔ توصیفی، ۱۳۸ نمونه آب راکد از مساجد و پارک‌های کاشان جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها پس از عبوردادن از فیلتر ۰/۴۵میکرونی و کشت در آگار غیرمغذی از نظر آمیب آزادزی بررسی شدند. برای شناسایی مولکولی *آکانتامبا* از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. پس از تکثیر قطعهٔ ۴۹۰bp و تعیین توالی نوکلئوتیدی، ژنوتایپ ۱۰ ایزولهٔ *آکانتامبا* شناسایی شد. pH، دما، فصل نمونه‌گیری و نتایج در SPSS نسخهٔ ۱۶ ثبت و تحلیل شد.

یافته‌ها: ۸۸/۴ درصد از نمونه‌ها آلوده به آمیب آزادزی بودند که با استفاده از PCR ۵۹/۴ درصد آنها به‌عنوان *آکانتامبا* شناسایی و تأیید شدند. از میان نمونه‌های تأییدشده ۸۰ درصد مربوط به ژنوتایپ *آکانتامبا* T4 و ۲۰ درصد T2 بودند. بین فصول نمونه‌گیری و آلودگی با آمیب آزادزی ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($P = ۰/۰۱$). بیشترین میزان آلودگی آب راکد به آمیب آزادزی و *آکانتامبا* در pH۷ مشاهده شد. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین pH و دما با آلودگی آمیب آزادزی و *آکانتامبا* مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که آلودگی آب‌های راکد به آمیب آزادزی و *آکانتامبا* در کاشان بالا است. همچنین ژنوتیپ غالب *آکانتامبا* T4 است که از سویه‌های بیماری‌زا است. با توجه به عوارض خطرناک ناشی از این آمیب، آموزش بهداشت برای افزایش آگاهی در زمینهٔ انتقال و نیز اقدامات بهداشتی برای پیشگیری از آلودگی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: آب‌های راکد، آمیب آزادزی، *آکانتامبا*، ژنوتایپ

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

مقدمه

جنس‌های گوناگون آمیب‌های آزادزی از منابع محیطی از جمله آب، خاک، گردوغبار و فاضلاب جدا شده‌اند. برخی گونه‌های این آمیب‌ها زندگی دوگانه دارند و قادرند ضمن زندگی آزاد، به‌شکل اتفاقی انسان را نیز آلوده کنند. اگرچه همهٔ آمیب‌های آزادزی بالقوه بیماری‌زا هستند؛ اما جنس‌های *آکانتامبا*، نگلریا و بالاموثیا بیشتر در انسان و دیگر حیوان‌ها، مننگوانسفالیت آمیبی، بیماری‌های چشمی و پوستی ایجاد می‌کنند (۱،۲). گونه‌های *آکانتامبا*، رایج‌ترین تک‌یاخته‌های آمفی زوئیک هستند که معمولا در محیط‌های خشک و مرطوب در سراسر جهان وجود دارند. این آمیب از زیستگاه‌های متنوعی از جمله آب‌های راکد، آب بطری آشامیدنی، استخرهای شنا، یونیت‌های دندان‌پزشکی، مواد شست‌وشودهندهٔ لنز و دیالیز و گردوغبار جدا شده است (۳،۴). *آکانتامبا* در سیر تکاملی خود به دو شکل مشاهده می‌شود. فرم تروفوزوئیت توانایی تغذیه از منابع گوناگون را دارد و از راه تقسیم دوتایی زیاد می‌شود. فرم مقاوم یا کیستی از مقاومت بسیار بالایی نسبت به شرایط نامساعد محیطی برخوردار است (۵). کیست‌ها

چندین سال زنده می‌مانند و بیماری‌زایی خود را در محیط حفظ می‌کنند (۶). کیست‌ها از راه خاک، آب و گردوغبار آلوده می‌توانند وارد بافت‌های بدن انسان و منجر به بروز بیماری شوند. همچنین ممکن است آمیب از راه خراش در پوست یا آسیب‌دیدن و ضربه‌خوردن اپی تلیوم قرنیه به‌علت ورود جسم خارجی و همچنین استفاده از لنزهای تماسی به بدن راه پیدا کند (۱).

چندین‌گونه از جنس *آکانتامبا* شناسایی شده است که در صورت ورود به بدن انسان ممکن است آنسفالیت آمیبی گرانولوماتوز کشنده، ضایعات پوستی و نیز کراتیت آمیبی ایجاد کنند. بروز کراتیت آمیبی در طول سه دهۀ گذشته به‌شکل چشم‌گیری افزایش یافته است (۷). کراتیت *آکانتامبا*یی عفونتی حاد است و قرنیه را درگیر می‌کند. این بیماری در افرادی که سیستم ایمنی نرمال هم دارند ایجاد می‌شود و از راه واردشدن تروما به قرنیه و یا به‌دلیل رعایت‌نکردن اصول بهداشتی در استفاده از لنزهای تماسی رخ می‌دهد (۸). در ایران نیز نمونه‌های تشخیص داده‌شده در دانشکدۀ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران از سال ۱۳۷۴ افزون بر ۱۵۰ نمونه بوده اند که علت آن را بیشتر استفاده از لنزهای نرم گزارش کرده‌اند (۷).

منطقۀ کاشان به‌دلیل شرایط آب‌وهوایی خاص مثل میانگین پایین بارش سالیانه و میزان زیاد گردوغبار، یکی از مناطق مهمی است که ساکنینش در معرض خطر آلودگی با آمیب‌های آزادزی قرار دارند. با توجه به نقش مهم *آکانتامبا* در ایجاد کراتیت‌های آمیبی و آنسفالیت‌های گرانولوماتوز (۹-۸، ۱) و با توجه به شیوع روبه‌افزایش کراتیت‌های آمیبی در ایران (۷) و انتقال *آکانتامبا* از راه آب، خاک و گردوغبار آلوده به کیست آمیب (۱)، مطالعۀ حاضر با هدف شناسایی آمیب‌های آزادزی و تعیین ژنوتایپ‌های *آکانتامبا* در کاشان انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعۀ مقطعی، در بازۀ سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۴، ۱۳۸ نمونه آب راکد شامل ۱۰۴ نمونه آب حوضچه‌های پارک‌ها و ۳۴ نمونه از آب حوض‌های مساجد شهر کاشان نمونه‌برداری شدند. هر نمونه آب به‌میزان ۵۰۰میلی‌لیتر در بطری‌های درپوش‌دار استریل جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کاشان از نظر آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* بررسی شد. ارتباط عوامل محیطی نظیر دما، pH و فصل با آمیب آزادزی و *آکانتامبا* بررسی شد.

جداسازی آمیب‌های آزادزی

الف) فیلتراسیون نمونه‌ها:

هریک از نمونه‌های آب جمع‌آوری‌شده ابتدا از فیلترهای ۰/۴۵ میکرون نیتروسلولز (شرکت بیوتک آلمان) و با استفاده از پمپ خلاء AEI (ساخت انگلستان) عبور داده شدند. برای جلوگیری از آلودگی نمونه‌ها، پس از فیلترکردن هریک از نمونه‌ها، دستگاه شسته و خشک شد.

ب) کشت:

فیلترها روی محیط کشت آگار غیرمغذی (Non-Nutrient Agar) (NNA) غنی‌شده با *اشرشیاکلی* در دمای ۲۸-۲۶ درجۀ سلسیوس به‌مدت یک ماه انکوبه و از نظر داشتن ترفوزوئیت یا کیست آمیب آزادزی بررسی شدند (۷). از نمونۀ مثبت *آکانتامبا* و سرم فیزیولوژی استریل به‌عنوان کنترل‌های مثبت و منفی در کشت استفاده شد. نمونه‌های مثبت مجدد پاساژ داده شدند و کلنی‌های آمیب آزادزی پس از شست‌وشو با سرم فیزیولوژی استریل، جمع‌آوری و رسوب حاوی آمیب تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجۀ سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج DNA:

استخراج DNA با استفاده از کیت DynaBio TM DNA Extraction Mini Kit شرکت تکاپوزیست و طبق دستورالعمل مربوطه انجام شد. DNAهای استخراج‌شده تا زمان ارزیابی با PCR، در دمای ۲۰- درجۀ سلسیوس نگهداری شدند.

***تشخیص آکانتامبا* با PCR:**

شناسایی *آکانتامبا* از سایر آمیب‌های آزادزی با روش PCR و پرایمرهای JDp2 و JDp1 اختصاصی ژن 18SrRNA انجام شد. PCR طبق برنامه انجام شد. دناتوراسیون در ۹۴ درجۀ سلسیوس به‌مدت ۴ دقیقه، ۳۳ سیکل، دناتوراسیون در ۹۴ درجۀ سلسیوس به‌مدت ۳۵ ثانیه، آنیلینگ ۵۷ درجۀ سلسیوس به‌مدت ۴۵ ثانیه و طویل‌سازی در ۷۲ درجۀ سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و طویل‌سازی نهایی در ۵ دقیقه.

محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز و با ترانس لومیناتور بررسی شد. مشاهده باند اختصاصی ۴۹۰bp نشان‌دهندۀ وجود *آکانتامبا* در نمونه و مثبت‌بودن آلودگی در نظر گرفته شد.

تعیین توالی نوکلئوتیدهای محصول PCR (PCR Sequencing):

محصول PCR به‌دست‌آمده از ۱۰ نمونهٔ جداشده از آب راکد برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره‌جنوبی ارسال شد. پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی نمونه‌های ارسال‌شده، هریک از توالی‌ها در پایگاه NCBI و با استفاده از نرم‌افزار بلاست ارزیابی شدند. در ادامه با توجه به میزان تشابه هریک ازتوالی‌های نوکلئوتیدی با توالی‌های استاندارد و ثبت‌شده در بانک ژن این پایگاه، ژنوتیپ هریک از نمونه‌ها، مشخص شد. همچنین پس از تعیین و تأیید ژنوتیپ ۱۰ ایزولهٔ *آکانتامبا*، جزئیات کامل هریک در بانک ژن NCBI ثبت شد.

تجزیه‌وتحلیل اطلاعات:

پس از ورود داده‌ها در نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۱۶ با آزمون مجذور کای و فیشر، آنالیز آماری انجام شد.

یافته‌ها

براساس نتایج بررسی حاضر، از ۱۳۸ نمونه آب‌های راکد بررسی‌شده با روش کشت، ۱۲۲ نمونه (۸۸/۴ درصد) از نظر آمیب‌های آزادزی مثبت بودند. در بررسی مولکولی (PCR)، میزان آلودگی به *آکانتامبا* در ۸۲ نمونه (۵۹/۴ درصد) تأیید شد (شکل ۱ و جدول ۱).

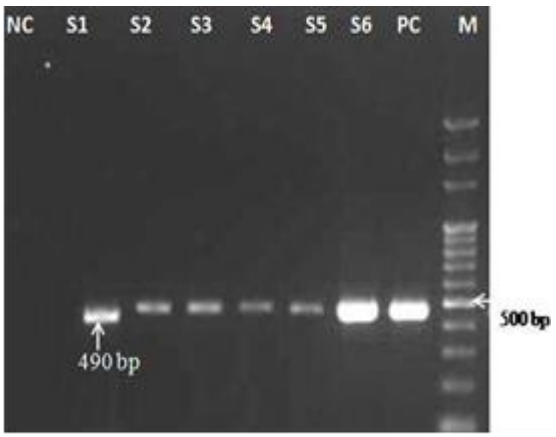
بیشترین میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* در آب جمع‌آوری‌شده از مساجد به‌ترتیب ۳۳ نمونه (۹۷/۱ درصد) و ۲۱ نمونه (۶۱/۸ درصد) بود (جدول ۱). بیشترین زمان جداسازی آمیب‌های آزادزی در روز هفتم کشت (۹۵/۱ درصد) گزارش شد و در روز سی‌ام (۴/۱ درصد) بود. بیشترین میزان آلودگی به آمیب آزادزی و *آکانتامبا* در pH ۷ مشاهده شد (نمودار ۱).

بیشترین میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* در دمای ۳۰-۲۶ درجهٔ سلسیوس مشاهده شد که به‌ترتیب ۲۹/۵ درصد و ۳۴/۱ درصد بود (P = ۰/۱)، (P = ۰/۲۲) (نمودار ۲).

بیشترین میزان آلودگی به آمیب آزادزی در زمستان (۱۰۰ درصد) و کمترین در تابستان (۷۷/۸ درصد) دیده شد (P = ۰/۰۱). همچنین بیشترین میزان آلودگی به *آکانتامبا* در تابستان (۶۶/۷ درصد) و کمترین در زمستان (۵۶/۸ درصد) مشاهده شد.

۱۰ ایزولهٔ *آکانتامبا* تعیین توالی شد که ۸ ایزوله (۸۰ درصد) ژنوتیپ T4 و ۲ ایزوله (۲۰درصد) T2 بودند. میزان مشابهت توالی نوکلئوتیدها با سایر ایزوله‌ها ۱۰۰-۹۸ درصد بود. لازم به توضیح است ژنوتیپ‌های T4 و T2 بیماری‌زا هستند. ۱۰ ایزولهٔ *آکانتامبا* در بانک ژن، با شماره‌های زیر ثبت شدند. شمارهٔ ثبت ژن‌ها و ژنوتیپ:

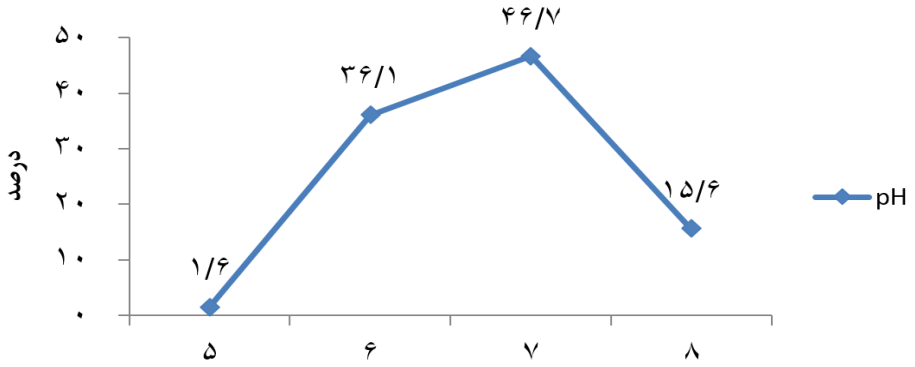
LC177107.1-LC177108.1: T2
LC276833.1-35 ، :LC276875.1-76 , LC276879
,LC276364.1-65: T4



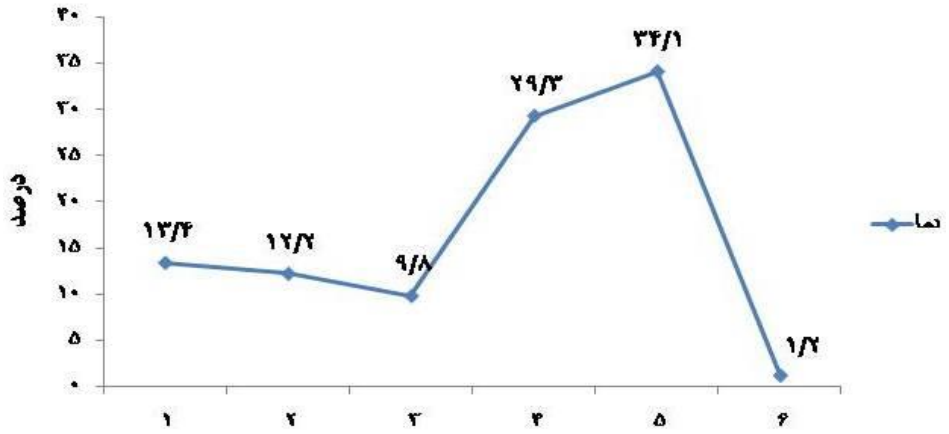
شکل ۱. الکتروفورز قطعهٔ تکثیریافته با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *آکانتامبا* JDP2 , JDP1 بر ژل آگاروز ۱/۵ درصد در آب‌های راکد کاشان. M مارکر وزنی ۱۰۰bp، NC کنترل منفی، PC کنترل مثبت، S1-S6 نمونه‌های مثبت *آکانتامبا*

جدول ۱. توزیع فراوانی آلودگی آب‌های راکد به آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* برحسب محل نمونه‌گیری

تک‌یاخته / محل نمونه‌گیری	آمیب آزادزی		*آکانتامبا*		جمع
	مثبت تعداد (درصد)	منفی تعداد (درصد)	مثبت تعداد (درصد)	منفی تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
مسجد	۳۳ (۹۷/۱)	۱ (۲/۹)	۲۱ (۶۱/۸)	۱۳ (۳۸/۲)	۳۴ (۱۰۰)
پارک	۸۹ (۸۵/۶)	۱۵ (۱۴/۴)	۶۱ (۵۸/۷)	۴۳ (۴۱/۳)	۱۰۴ (۱۰۰)
جمع	۱۲۲ (۸۸/۴)	۱۶ (۱۱/۶)	۸۲ (۵۹/۴)	۵۶ (۴۰/۶)	۱۳۸ (۱۰۰)
***P*.value**	۰/۰۰۱		۰/۷۴		



نمودار ۱. توزیع آلودگی به آمیب آزادزی برحسب pH آب‌های راکد



۱: ۱۰°C- ۶ ، ۲: ۱۵°C- ۱۱ ، ۳: ۲۰°C- ۱۶ ، ۴: ۲۵°C- ۲۱ ، ۵: ۳۰°C- ۲۶ ، ۶: ۳۵°C- ۳۱

نمودار ۲. توزیع آلودگی آب‌های راکد به *آکانتامبا* برحسب دما

بحث

با ارزیابی نمونه‌های آب راکد جمع‌آوری‌شده از سطح شهر کاشان، مشخص شد که حدود ۸۸ درصد از آب‌های راکد سطح شهر به آمیب‌های آزادزی آلوده‌اند (CI = ۰/۸۳۱ - ۰/۹۳۷). در مطالعه‌ای که از سوی Hosseinbigi (۲۰۱۲) و همکاران و نیز Aghajani و همکاران (۲۰۱۶) انجام شده است، آلودگی به آمیب‌های آزادزی را در آب پارک‌ها و میدان‌های قزوین و سیستان به‌ترتیب ۸۰ درصد و ۸۸ درصد گزارش شد (۱۱-۱۰). نتایج مطالعهٔ حاضر با نتایج مطالعات بیان‌شده همخوانی دارد و وفور بسیار زیاد آمیب‌های آزادزی را در نمونهٔ آب‌های راکد نشان می‌دهد.

اما در مطالعهٔ Solhjoo و همکاران (۲۰۱۲) میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی در منابع آبی شیراز ۳۵ درصد گزارش شده است که کمتر از نتایج مطالعهٔ حاضر است (۱۲). همچنین میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی را در آب‌های لوله‌کشی ترکیه ۲۲درصد و در آب‌های خانگی فلوراید ۱۹/۴درصد گزارش کرده‌اند (۱۳،۱۴). طبق مطالعات موجود شیوع آمیب‌های آزادزی در آب‌های خانگی و تصفیه‌شده نسبت‌به آب‌های راکد کمتر است. در آب‌های لوله‌کشی به‌دلیل تماس‌نداشتن آب با عوامل آلوده‌کننده و نیز ضدعفونی‌کردن آب با کلر که باعث انهدام ترفوزوئیت آمیب می شود، سطح آلودگی کمتر است. در مطالعهٔ اخیر میزان آلودگی آب های راکد به *آکانتامبا* ۵۹/۴ درصد گزارش شد (۰/۹۳۷ - ۰/۸۳۱ = CI). همچنین میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* در آب مساجد (P = ۰/۰۰۱) بیشتر از پارک‌ها (P = ۰/۷۴) بود. لازم به توضیح است که عادت غیربهداشتی کشیدن آب وضو به بینی، احتمال ورود این انگل‌ها و احتمال بروز بیشتر انسفالیت گراتولوماتوز آمیبی می‌شود.

محققان سایر مطالعات انجام‌شده در ایران، میزان *آکانتامبا* در آب‌های راکد تهران را ۳۲ درصد (۱۵)، قزوین ۴۳ درصد (۱۰)، سیستان ۴۷/۵ درصد (۱۱) و جنوب غربی ایران را ۵۰ درصد (۱۶) گزارش کرده‌اند. همچنین در مطالعات خارجی شیوع *آکانتامبا* را در آب‌های سطحی تایوان ۵۱/۷ درصد (۱۷) و در منابع آب‌های تفریحی غرب هند ۵۰/۶ درصد (۱۸) و در لهستان ۸ درصد (۱۹) گزارش کرده‌اند. همهٔ این مطالعات سطح کمتر آلودگی را در مقایسه با این مطالعه نشان می‌دهد.

تفاوت شیوع *آکانتامبا* در مطالعات مختلف ممکن است ناشی از تنوع منابع بررسی‌شده، شرایط محیطی و آب‌وهوایی، تفاوت روش استخراج DNA و نوع پرایمر استفاده‌شده باشد. *آکانتامبا* در آب‌های حوضچه‌های میدان‌ها، پارک‌ها و مسجدها نسبت به آب‌های تصفیه‌شدهٔ لوله‌کشی خانگی بیشتر است. دلایل میزان زیاد آلودگی آب‌های راکد به *آکانتامبا* ممکن است به عواملی مثل مقاومت به حرارت، اسمولاریتهٔ بالا و همچنین رشد در ۱۲ - ۴ pH وابسته باشد (۱،۷). در کاشان به‌دلیل وزش بادهای شدید و گردوغبار و میزان کم بارندگی شرایط برای وفور آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* مهیا است.

تا کنون ۲۰ ژنوتیپ گوناگون *آکانتامبا* (T1-T20) شناسایی شده است که از ژنوتیپ‌های پاتوژن می‌توان به T3،T5،T4 اشاره کرد (۹). در مطالعهٔ Lasjerdi و همکاران (۲۰۱۱) روی بیماران نقص ایمنی تهران T4 و T5 (۲۰) و در نمونه‌های بالینی ژاپن به ترتیب T4 و T3 و T15 شایع‌ترین ژنوتیپ‌های جداشده بودند (۲۱).

مطالعات مختلف بیانگر این است که بیشترین ژنوتیپ جداشده از منابع محیطی و نمونه‌های بالینی ژنوتیپ T4 است (۲۲). در مطالعهٔ اخیر، نتایج تعیین توالی نشان داد که بیشترین ژنوتیپ *آکانتامبا* T4 (۸۰ درصد) و T2 (۲۰ درصد) است که با نتایج سایر مطالعات شباهت دارد (۱۷-۱۵). Maghsood و همکاران، ژنوتیپ T4 و T2 *آکانتامبا* را در نمونه‌های بالینی گزارش کرده‌اند (۲۴). ژنوتیپ‌های بیماری‌زایی مثل ژنوتیپ T4 ممکن است بیماری‌های خطرناکی از جمله آنسفالیت گرانولوماتوز آمیبی (GAE)، کراتیت آمیبی (AK) وگرانولوماتوز پوستی *آکانتامبایی* (۲۵) ایجاد کنند. همچنین مرگ‌ومیر ناشی از انسفالیت آمیبی مرتبط با این ژنوتیپ گزارش شده است (۲۶). کراتیت *آکانتامبایی* ممکن است افرادی را حتی با ایمنی سالم و کارآمد گرفتار کند و در نهایت سبب کاهش بینایی و کوری فرد شود (۲۳-۲۲).

بر پایهٔ نتایج به‌دست‌آمده بین آلودگی به آمیب آزادزی و فصل، ارتباط معنی‌داری مشاهده شد (P = ۰/۰۱) (به‌شکلی که بیشترین میزان آلودگی به *آکانتامبا* در تابستان وجود داشت (P=۰/۳۸). همچنین بیشترین آلودگی به آمیب آزادزی و *آکانتامبا* در آب‌هایی با دمای ۳۰-۲۶ درجهٔ سلسیوس مشاهده شد که با توزیع آلودگی فصلی هماهنگی دارد. در مطالعهٔ حاضر بیشترین میزان آلودگی آب راکد به آمیب آزادزی (۴۶/۷ درصد) و آکانتامبا (۵۰ درصد) در آب‌هایی با pH ۷ مشاهده شد که با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد (۲۹-۲۷).

نتیجه‌گیری

براساس نتایج این مطالعه و مقایسه با دیگر مطالعات گزارش‌شده، میزان آلودگی آب‌های راکد به آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* در کاشان بیشتر از دیگر نقاط ایران و حتی جهان است. همچنین بیشتر ژنوتایپ‌های *آکانتامبا* T4 بود. با توجه به بیماری‌زابودن این ژنوتیپ و به‌ویژه نقش آن در بروز کراتیت آمیبی و انسفالیت گرانولوماتوزی آمیبی، به‌سازی محیط و آموزش بهداشت برای کنترل و پیشگیری آلودگی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از معاون محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان برای حمایت مالی (طرح پژوهشی ۹۴۱۲۵) قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Visvesvra GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007;50(1):1-26. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x PMID:17428307
2. Shin HJ, Im KI. Pathogenic free-living amoebae in Korea. Korean J Parasitol. 2004;42(3):93-119. https://doi.org/10.3347/kjp.2004.42.3.93 PMCID:PMC2717367
3. Tawafeek GM, Bishara SA, Sarhani RM, Tahre EE , Khayyal AE. Genotypic, physiological, and biochemical characterization of potentially pathogenic Acanthamoeba isolated from the environment in Cairo, Egypt. Parasitol Res. 2016;115(5):1871-81. https://doi.org/10.1007/s00436-016-4927-3 PMID:26841771
4. Hassan A, Farouk H, Hassanein F, Abdul-Ghani R, Abdelhady AH. Acanthamoeba contamination of hemodialysis and dental units in Alexandria, Egypt: A neglected potential source of infection. J Infect Public Health . 2012;5(4):304-10. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2012.06.001 PMID:23021653
5. Stockman LJ, Wright CJ, Visvesvara GS, Fields BS, Beach MJ. Prevalence of Acanthamoeba spp. and other free living amoebae in household water, Ohio, USA-1990-1992. Parasitol Res. 2011;108(3):621-7. https://doi.org/10.1007/s00436-010-2120-7 PMID:20978791
6. Coulon C, Collignon A, McDonnell G, Thomas V. Resistance of Acanthamoeba cysts to disinfection treatments used in health care settings. J clin Microbiol. 2010;48(8):2689-97. https://doi.org/10.1128/JCM.00309-10 PMID:20519477 PMCID:PMC2916629
7. Edrissian G, Rezaeian M, Mohebali M, Keshavarz H. Medical Protozoology. 2nd Ed. Tehran: Tehran University of Medical Sciences; 2015. PMCID:PMC4724830
8. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. Parasite Vectors. 2012;5:6. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-6 PMID:22229971 PMCID:PMC3284432
9. Sekhar Behera H, Panda A, Satpathy G, Bandivadekar P, Vanathi M, Agarwal T, et al. Genotyping of Acanthamoeba spp. And characterization of the prevalent T4 type along with T10 and unassigned genotypes from amoebic keratitis patients in India. J Med Microbiol. 2016;65(5):370-6. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000234 PMID:26887324
10. Hosseinbigi B, Sarie SahnehSaraie M, Alizadeh S, Rasti S, Eftakhar M, Khosro-Shahi N et al . Isolation and molecular identification of Acanthamoeba in surface stagnant waters of Qazvin. J Qazvin Univ Med Sci. 2012;16(3):26-32.
11. Aghajani A , Dabirzadeh M , Maroufi Y , Hooshyar H. Identification of Acanthamoeba Genotypes in Pools and Stagnant Water in Ponds in Sistan Region in Southeast Iran.Turkiye Parazitol Derg. 2016;40(3):132-6. https://doi.org/10.5152/tpd.2016.4428
12. Solhjoo K, Ghadar-ghadr SH, Zia-Jahromi S. Identification of Acanthamoeba species in water sources by PCR. J Jahrom Univ Med Sci. 2012;10(3):33-41.
13. Coşkun KA, Özçelik S, Tutar L, Elaldı N, Tutar Y. Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. BioMed research international. 2013;2013;1-9.
14. Shoff M, Rogerson A, Kessler K, Schatz S, Seal D. Prevalence of Acanthamoeba and other naked amoebae in South Florida domestic water. J Water Health. 2008;6(1):99-104. https://doi.org/10.2166/wh.2007.014 PMID:17998610
15. Nazar M, Haghighi A, Niyyati M, Eftekhar M, Tahvildar-Biderouni F, Taghipour N, et al. Genotyping of Acanthamoeba isolated from water in recreational areas of Tehran, Iran. J Water Health. 2011;9(3):603-8. https://doi.org/10.2166/wh.2011.152 PMID:21976207
16. Niyyati M, Saberi R, Latifi A, Lasjerdi Z. Distribution of Acanthamoeba Genotypes Isolated from Recreational and Therapeutic Geothermal Water Sources in Southwestern Iran. Environ Health Insights. 2016;10:69-74. https://doi.org/10.4137/EHI.S38349
17. Kao PM, Hsu BM, Chen CT, Huang SW, Kao ES, Chen JL, et al. Identification and quantification of the Acanthamoeba species and genotypes from reservoirs in Taiwan by molecular techniques. Acta Trop. 2014;132:45-50.

https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.020 PMID:24388954

18. Todd CD, Reyes M, Pinero JE, Martinez E, Valladares B, Streete D, et al. Isolation and molecular characterization of Acanthamoeba genotypes in recreational and domestic water sources from Jamaica, West Indies. J Water Health. 2015;13(3):909-19. https://doi.org/10.2166/wh.2015.232

19. Lass A, Szostakowska B, Idzińska A, Chomicz L. The first genotype determination of Acanthamoeba potential threat to human health, isolated from natural water reservoirs in Poland. Parasitol Res. 2014;113(7):2693-99. https://doi.org/10.1007/s00436-014-3925-6 PMID:24770720 PMCID:PMC4058056

20. Lasjerdi Z, Niyyati M, Haghighi A, Shahabi S, Biderouni FT, Taghipour N, et al. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. Parasitol Res. 2011;109(3):575-80. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2288-5 PMID:21365453

21. Rahman M M, Yagita K, Kobayashi A, Oikawa Y, Hussein AI, Matsumura T, Tokoro M. Genetic Characterization of Clinical Acanthamoeba Isolates from Japan using Nuclear and Mitochondrial Small Subunit Ribosomal RNA. Korean J Parasitol, 2013;51(4):401-11. https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.4.401 PMID:24039282 PMCid:PMC3770870

22. Khan NA. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(4):564-95. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x PMID:16774587

23. Zhao G, Sun S, Zhao J, Xie L. Genotyping of Acanthamoeba isolates and clinical characteristics of patients with Acanthamoeba keratitis in China. J Med Microbiol. 2010;59(Pt4):462-66. https://doi.org/10.1099/jmm.0.016667-0 PMID:20056772

24. Maghsood AH, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA. Acanthamoeba genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. J Med Microbiol. 2005;54(8):755-59. https://doi.org/10.1099/jmm.0.45970-0 PMID:16014429

25. Khan NA. Pathogenesis of Acanthamoeba infections. Microb Pathog. 2003;34(6):277-85. https://doi.org/10.1016/S0882-4010(03)00061-5

26. Khan A. Acanthamoeba spp in Emerging Protozoan Pathogens. New York: Taylor and Francis; 2008. p. 3-69.

27. Ghadar-ghadr Sh, Solhjoo K, Norouz-nejad MJ, Rohi R, Zia-Jahromi S. Isolation and identification of free living amoeba)Naegleria and Acanthamoeba) in Shiraz water resources by morphological criteria. J Jahrom Univ Med Sci. 2012;10(3):26-33. https://doi.org/10.29252/jmj.10.3.33

28. Sente C, Erume J, Naigaga I, Kimuda Magambo P, Ochwo S, Mulindwa J, et al. Occurrence and genetic characterisation of Acanthamoeba spp. from environmental and domestic water sources in Queen Elizabeth Protected Area, Uganda. Parasit Vectors. 2016;9:127. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1411-y PMID:26935431 PMCid:PMC4776447

29. Lekkla A, Sutthikornchai Ch, Bovornkitti S,Sukthana Y. Free-living Ameaba contamination in natural hot spring in Thailand. The Southeast Asian J Trop Med Pub Health. 2005;36(S4):5-9. PMID:16438171