Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences No 85, Volume 24, Issue 3, Autumn 2017, Pages: 236-243

Original Article

doi: 10.18869/acadpub.ajcm.24.3.236

Frequency and Genotyping of *Acanthamoeba* Species in the Swimming Pools and Ponds of Khoramabad, Iran, in 2016

Majid Faraji[1], Amirhossein Maghsood[2], Shirzad Fallahi[3], Ali Chegeni Sharafi[4], Azadeh Karimi[4], Zohreh Lasjerdi[5], Mohammad Fallah[6,*]

[1] *MSc in Parasitology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
[2] *Associate Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
[3] *Assistant Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran*
[4] *MSc in Parasitology, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran*
[5] *MSc in Parasitology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[6] *Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*

**** Corresponding Author:*** *Mohammad Fallah, Department of Parasitology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Email: fallah@umsha.ac.ir*

Received: 14.05.2017
Accepted: 10.09.2017

How to Cite this Article:
Faraji M, Maghsood A, Fallahi Sh, Chegeni Sharafi A, Karimi A, Lasjerdi Z, Fallah M. Frequency and Genotyping of *Acanthamoeba* Species in the Swimming Pools and Ponds of Khoramabad, Iran, in 2016. *Sci J Hamadan Univ Med Sci*. 2017;24(3): 236-243. DOI: 10.18869/acadpub.ajcm.24.3.236.

Abstract

Background and Objective: *Acanthamoeba* is a free-living and opportunistic amoeba found in the water, soil, and air. This amoeba causes granulomatous amoebic encephalitis in the immunocompromised patients and amoebic keratitis in the people using contact lenses. The genotypes of *Acanthamoeba* are pathogenic and non-pathogenic. Regarding this, the present study aimed to determine the frequency and genotypes of *Acanthamoeba* in the water pools and ponds of Khorramabad, Iran, using culture, polymerase chain reaction (PCR), and sequencing methods in 2016.

Materials and Methods: This study was conducted on a total of 84 water samples collected from the water pools and ponds of Khorramabad. The samples were filtered using nitrocellulose syringe (0.45 µm); subsequently, they were cultured on 1.5% non-nutrient agar, covered by killed *Escherichia coli* and incubated at 27ºC. After the extraction of DNA from positive samples, PCR was performed using specific primers to detect and confirm *Acanthamoeba*. Then, for genotyping, the PCR products of positive samples were sequenced.

Results: Out of the 84 water samples, 50 (59.5%) cases were positive for amoeba in the culture method. However, the results of the PCR revealed 35 (41.7%) positive samples for *Acanthamoeba*. The sequencing of the PCR products demonstrated that 17 samples were *T4* genotype (pathogen), and the rest were other *Acanthamoeba* genotypes.

Conclusion: This study indicated the high prevalence of *Acanthamoeba* species, especially the pathogenic type, in the water pools of Khoramabad that could be a source of infection risk for humans. Regarding the fact that almost half of the found genotypes were pathogenic (genotype *T4*) that are the main cause of amoebic keratitis, these water bodies could be a potential risk factor for the public health. Therefore, the health professionals should prevent contamination.

Keywords: *Acanthamoeba*; Genotype; Polymerase Chain Reaction; Water

Copyright © 2017 Hamadan University of Medical Sciences

مقاله پژوهشی

doi: 10.18869/acadpub.ajcm.24.3.236

فراوانی گونه های آکانتامبا در آب استخرها و حوضچه های شهر خرم آباد و تعیین ژنوتیپ های آن درسال ۱۳۹۵

مجید فرجی[۱]، امیر حسین مقصود[۲]، شیرزاد فلاحی[۳]، علی چگنی شرفی[۴]، آزاده کریمی[۴]، زهره لاسجردی[۵]، محمد فلاح[۶،*]

[۱] کارشناسی ارشد انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
[۲] دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
[۳] استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
[۴] کارشناسی ارشد انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
[۵] کارشناسی ارشد انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۶] استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

* **نویسنده مسئول:** محمد فلاح، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.
ایمیل: fallah@umsha.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۲۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۶/۱۹

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

چکیده

سابقه و هدف: آکانتامبا آمیبی فرصت‌طلب ساکن آب، خاک و هوا است. این آمیب می‌تواند در افراد دارای نقص سیستم ایمنی باعث آنسفالیت آمیبی گرانولوماتوز و در افرادی که ازلنز تماسی چشم استفاده می‌کنند ایجاد کراتیت آمیبی کند. تعدادی از ژنوتیپ‌های آکانتامبا بیماری‌زا و برخی غیر بیماری‌زا هستند. این مطالعه باهدف تعیین فراوانی و شناسایی ژنوتیپ های آکانتامبا در آب استخرها وحوضچه‌های شهر خرم آباد با روش های کشت، PCR و توالی یابی در سال ۱۳۹۵ انجام شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۸۴ نمونه از آب استخرها و حوضچه‌های خرم‌آباد جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از فیلترهای سرنگی نیتروسلولز ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شده و سپس فیلتر در محیط کشت آگار غیرمغذی ۱/۵ درصد پوشیده با باکتری کشته‌شده. اشریشیا کلی و دمای۲۷°Cکشت داده شدند. پس از استخراج DNA ازنمونه های مثبت،جهت شناسایی آکانتامبا واکنشPCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت. به منظورتعیین ژنوتیپ‌های آکانتامبا،محصولPCR نمونه‌های مثبت تعیین توالی گردید.

یافته‌ها: از۸۴ نمونه آب جمع‌آوری شده از استخرها و حوضچه‌های شهر خرم‌آباد تعداد ۵۰ نمونه(۵۹/۵٪) دارای نتیجه کشت مثبت بودند که پس از استخراج DNA و انجام PCR ۳۵ نمونه(۴۱/۷٪) از نظر آکانتامبا مثبت بودند. پس از تعیین توالی محصولاتPCR، مشخص شد که ۱۷ نمونه دارای ژنوتیپT4 (۴۸/۵۷٪) و ۱۸ نمونه (۵۱/۴۲٪) دارای سایر ژنوتیپ های آکانتامبا می‌باشند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد شیوع بالای انواع آکانتامبا، بخصوص نوع بیماریزای آن، در استخرهای خرم آباد می تواند منشاء آلودگی برای انسان باشد. حدود نیمی از ژنوتیپ‌های یافت شده از نوع بیماری‌زا (ژنوتیپ T4) وعامل اصلی کراتیت آکانتامبایی می‌باشند. این منابع آبی به‌عنوان عامل بالقوه خطر برای سلامت عمومی بوده و تلاش متصدیان بهداشتی به‌منظورآموزش و پیشگیری از آلودگی ضروری است.

واژگان کلیدی: آب؛ آکانتامبا؛ ژنوتیپ؛ واکنش زنجیره ای پلیمراز

مقدمه

آکانتامبا از آمیب‌های آزادزی است که انتشار جهانی دارد و به طور گسترده در آب، خاک، هوا، فاضلاب و سایر محیط‌ها پراکنده است. این تک یاخته بیش از۲۰ گونه دارد که حدود نیمی از آنها برای انسان و حیوانات بیماری‌زا هستند. علی‌رغم انتشار بسیار گسترده گونه‌های بیماری‌زا، گزارش‌های محدودی درباره بیماری ناشی از آن‌ها در دست است [۱،۲]. اکثر گزارش‌ها مربوط به سال‌های اخیر و پس از رایج شدن استفاده از لنزهای تماسی چشم است. آکانتامبیازیس تظاهرات مغزی، پوستی، ریوی

و چشمی دارد که سه مورد اول بطور عمده در بیماران دچار اختلال ایمنی اتفاق می‌افتد. گونه‌های آکانتامبا به دو شکل تروفوزوئیت و کیست مشاهده می‌شوند. کیست آکانتامبا در مقابل کلرینه کردن آب و نیز ضد عفونی کردن سیستم‌های آب بیمارستان مقاوم هستند. زیستگاه معمول آکانتامبا آب است [۱،۳]. از جمله در آب استخرها به وفور یافت می‌شود و آگاهی از انتشاراین آمیب‌ها و بویژه ژنوتیپ‌های پاتوژن آن در آب‌هایی که انسان بطور مکرر و دائمی با آنها درتماس است به لحاظ بهداشت، حفظ و تامین سلامت افراد جامعه بسیار ارزشمند است. این تک‌یاخته دوگانه‌زی از عوامل مهم ایجاد عفونت در سیستم عصبی مرکزی انسان و حیوانات است که بیماری ناشی از آن در این شکل اکثر موارد منجر به مرگ می‌شود [۲].ژنوتیپ‌های آکانتامبا به‌دلیل شیوع و انتشار گسترده در طبیعت، از اهمیت ویژه‌ای بر خوردار هستند [۱]. آکانتامبا، شایع‌ترین و فراوان‌ترین آمیب آزادزی است که در محیط زندگی انسان وجود دارد [۴]. این تک‌یاخته، از زیستگاه‌های متنوعی چون آب شیرین، آب شور، شن‌های ساحل، فاضلاب‌ها و خاک از مناطق گرمسیر تا قطب شمال جدا شده است. آمیب به راحتی می‌تواند از محیط خانه مانند خاک گلدان، آکواریوم، آب لوله-کشی، ظرفشویی و دستگاه‌های مرطوب کننده جدا گردد. گزارشات متعددی از ایزوله‌های آکانتامبا در استخرهای شنا، بطری‌های آب معدنی، جکوزی‌ها، گردوغبار، ترشحات گوش و ریه و کشت‌های سلولی پستانداران وجود دارد. همچنین در محیط‌های درمانی، آمیب از واحدهای دیالیز، واحدهای دندانپزشکی، ونتیلاتورها، سیستم‌های تهویه و استخرهای هیدروتراپی جدا گردیده است[۵،۶].

کیست این آمیب بسیار مقاوم است و می‌تواند سال‌ها در محیط باقی بماند و به حیات خود ادامه دهد. این آمیب را بر اساس سکانس ژن rRNA، به ۱۹ژنوتیپ (T1- T19) طبقه بندی کرده‌اند [۷،۸].آکانتامبا از راه‌های مختلفی از جمله پوست آسیب دیده که در تماس با انگل است، یا از طریق مجاری تنفسی، بصورت کیست موجود در هوا یا آب وارد بدن انسان می‌شود. بعد از ورود به بدن از طریق جریان خون خود را به سیستم عصبی و دیگر اندام ها می‌رساند [۵]. در میان عفونت‌های ایجاد شده بوسیله آکانتامبا می‌توان انسفالیت گرانولوماتوز آمیبی، ضایعات گرانولوماتوز پوستی و کراتیت آمیبی مزمن را نام برد [۴،۹،۱۰]. امروزه مشخص شده است که آکانتامبا می‌تواند مستقیماً موجب آلوده شدن قرنیه شود [۱۱].

آب استخرها و حوضچه ها یکی از منابعی است که این آمیب در آن زندگی می‌کند و کراتیت آمیبی نیز ناشی از استفاده از آب غیر استریل برای شستشوی لنزهای تماسی چشم و یا شنا در استخرهای آلوده است.

در زمینه جداسازی آمیب‌های آزادزی از آب در مناطق غربی کشور مطالعات کمی صورت گرفته است و در مطالعات سایر نقاط ایران نیز در اکثر موارد روش‌های تشخیصی بکار رفته، غیر حساس (کشت و تشخیص با میکروسکوپ) بوده است [۱۲]. از آنجا که آب استخرهای آب شیرین و شور به عنوان مخزن آکانتامبا بوده تاکنون مطالعه‌ای در مورد میزان آلودگی آب استخرها وحوضچه‌های شهر خرم‌آباد به این تک‌یاخته انجام نشده است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی حضور آکانتامبا درآب استخرها وحوضچه‌های شهر خرم‌آباد و تعیین ژنوتیپ آمیب‌های جدا شده انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و کشت

این مطالعه مقطعی از مهرتا بهمن ماه ۱۳۹۵با نمونه‌برداری از آب استخرها و حوضچه‌های شهر خرم‌آباد انجام شد. مجموعاً ۸۴ نمونه آب، هریک به مقدار۱۰۰۰-۵۰۰ میلی‌لیتر از استخرها و حوضچه‌ها گرفته شده و از فیلتر سرنگی نیتروسلولزی با منافذ ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس فیلتر فوق بر روی محیط آگار غیر مغذی ۱/۵٪ حاوی باکتری اشریشیا کلی کشته شده برده شد و درداخل انکوباتور۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. از روز چهارم به بعد محیط‌های کشت بامیکروسکوب نوری و بزرگنمایی ۱۰۰X بررسی شد. پلیت‌های مثبت از نظر وجود کیست و یا ترفوزئیت آمیب‌های آزادزی برای انجام مراحل بعدی جدا شدند و سایرپلیت‌ها پس از یک ماه اگر آمیبی رشد نکرده بود دور ریخته شدند. جهت حذف قارچ‌ها و باکتری‌های مزاحم، پلیت مثبت چندین مرتبه پاساژ داده شد تا کشت خالص آمیب بدست آید. بطور خلاصه در کنارشعله با یک لوپ استریل از منطقه علامت‌گذاری شده کلنی‌های انگل بر داشته و به محیط کشت جدید انتقال داده می‌شد، دور پلیت محیط کشت با پارافیلم مسدود شده و محیط جدید طبق روال قبلی به انکوباتور انتقال داده می‌شد تا بطور دقیق مجدداً مورد بررسی قرارگیرد.

اندازه‌گیری شاخص های استاندارد آب

در تمام نمونه‌های آب میزان کلر اندازه‌گیری و نمونه‌های دارای کلر باقیمانده کمتر یا بیش از مقدار استاندارد تعیین شد. کلر باقیمانده استاندارد در آب استخرها ppm ۳-۱ می‌باشد. لازم به ذکر است حوضچه ۱ و حوضچه ۲ و دریاچه جزء آب‌های محیطی بشمار می‌آیند، لذا میزان کلر باقیمانده در آنها صفر می‌باشد. دمای آب‌های محل نمونه‌گیری نیز اندازه‌گیری شد. دمای استاندارد استخرها باید در محدوده دمایی ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد باشد.در راستای اهداف طرح pH آب‌های نمونه‌برداری شده هم اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA

نمونه‌های کشت مثبت جدا شده و ۵ سی‌سی بافرفسفات

سالین روی محیط کشت ریخته شد. سپس با سرنگ ۵ سی‌سی استریل ازکنار پلیت و کمی بالاتر از سطح محیط، بافرحاوی آمیب را وارد سرنگ کرده و محتویات سرنگ در لوله‌های مخصوص ریخته شده و در لوله‌ها با پارافیلم بسته شد. سه مرتبه عمل شستشو با سرعت ۴۰۰۰rpm انجام و محلول رویی خالی و رسوب حاصل که حاوی تعداد کافی آمیب جهت استخراج DNA می‌باشد به میکروتیوب انتقال داده شد. مقدار ۲۰میکرولیتر از رسوب حاصل از کشت شستشو شده روی لام گذاشته می‌شد و با بزرگنمایی ۱۰۰X و ۴۰۰X بررسی می‌گردید. DNA نمونه ها با استفاده از کیت شرکت تکاپوزیست (DynaBio TM DNA Extraction) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده استخراج شد.

واکنش PCR

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آکانتامبا (JDP1, JDP2) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR به شرح زیر می باشد:

JDP1: 5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3' و
JDP2: 5'- TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3'
[۱۳].

واکنش PCR به همراه DNA نمونه آکانتامبای استاندارد اخذ شده از گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی(به‌عنوان کنترل مثبت) در۳۳ سیکل به شرح زیر انجام گرفت:

جدا شدن دورشته هدف اولیه ۳ دقیقه در۹۴ درجه سانتی‌گراد و در هر سیکل، جدا شدن دو رشته هدف ۳۵ ثانیه در۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال اختصاصی پرایمر به توالی هدف ۴۵ ثانیه در۵۶ درجه سانتی‌گراد، طویل شدن یک دقیقه در۷۲ درجه سانتی‌گراد و طویل شدن نهایی ۵ دقیقه در۷۲ درجه سانتی‌گراد. محصول PCR بر روی ژل اگارز ۱٪ رنگ شده با سایبرسیف الکتروفورز گردید. انتظار می‌رفت نمونه‌های مثبت از نظر آکانتامبا باندی در حدود bp ۵۰۰ داشته باشند.

محصول PCR ایزوله‌های آکانتامبا جهت تخلیص و توالی یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم افزارکروماس ویرایش شد و سپس داده‌ها در برنامه بلاست سایت NCBI (National center for biotechnology Information) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و ژنوتیپ ایزوله‌ها مشخص گردید.

یافته‌ها

شاخص‌های استاندارد آب

از ۸۴ نمونه جمع‌آوری شده تعداد ۵۱ نمونه (۶۰/۷٪) دارای میزان باقیمانده کلر استاندارد بودند. ازنظر میزان باقیمانده کلر موجود در آب استخرها وحوضچه‌های شهرستان خرم‌آباد تنها دو استخر شهر دارای میزان باقیمانده کلر استاندارد بودند. به دلیل اینکه سه حوضچه و دریاچه داخل شهر جزء آبهای محیطی بشمار می‌آیند، لذا میزان کلر باقیمانده در آنها صفر می‌باشد. نظر به اینکه دمای استاندارد استخرها باید در محدوده دمایی ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد باشد، از ۸۴ نمونه جمع‌آوری شده ۶۰ نمونه (۷۱/۴٪) دارای دمای استاندارد بودند، ۲۴ نمونه (۲۸/۶٪) که از آب‌های محیطی از دریاچه و حوضچه ها جمع‌آوری شده بودند در محدوده دمایی خارج از دمای استاندارد قرار داشتند، این آب های محیطی تحت تأثیر دمای محیط بودند. تمامی ۸۴ نمونه (۱۰۰٪) از نظر pH اندازه‌گیری شده در محدوده pH استاندارد (۸-۷/۲) بودند (جدول ۱).

نتایج کشت و PCR

درمجموع از۸۴ نمونه آب ، تعداد۵۰ نمونه (۵۹/۵٪) از نظر آمیب‌های آزادزی دارای نتیجه کشت مثبت بودند و از ۵۰ نمونه دارای نتیجه کشت مثبت پس از استخراج DNA و انجام PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آکانتامبا (JDP1, JDP2) و الکتروفورز محصول PCR، ۳۵ نمونه باندی درحدود bp ۵۰۰ نشان دادند(جدول۲ ، شکل ۱).

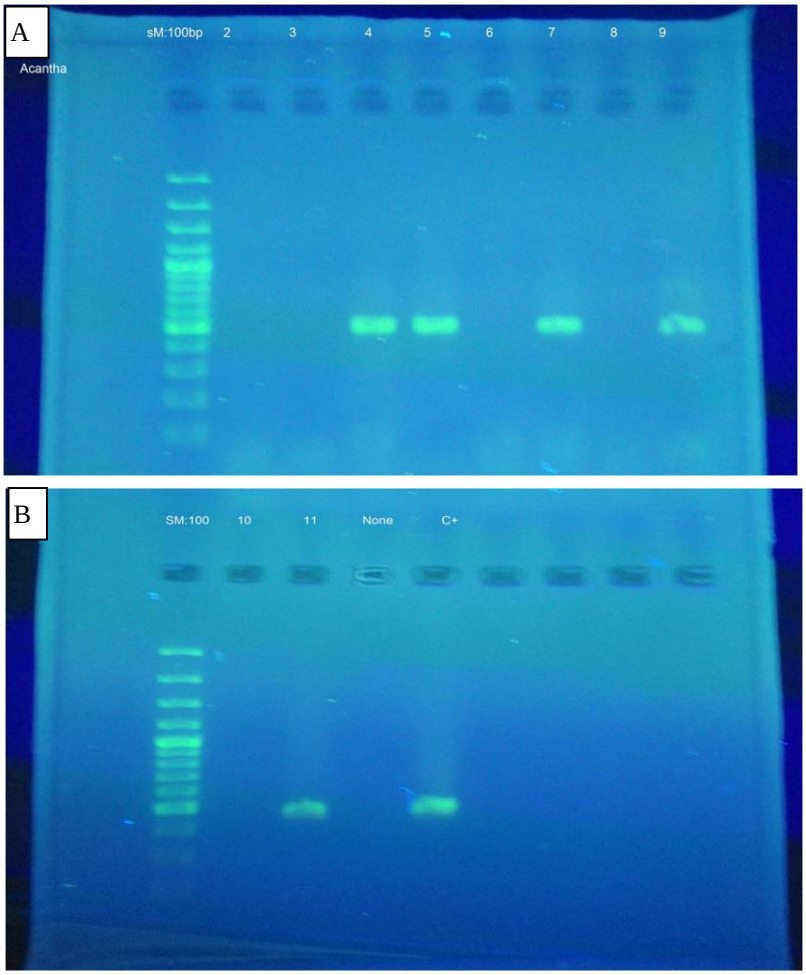
تحلیل داده‌های حاصل از کشت نمونه‌ها و متغیرهای میزان کلر، pH ودما با آزمون آماری مجذور کای نشان داد که بین نتیجه کشت نمونه‌های آب و میزان کلر موجود در آب رابطه معنی‌داری وجود دارد (P=۰/۰۰۷) (درحالی که میان سایر

جدول ۱: میزان کلر، دما و pH آب استخرها و حوضچه های مورد مطالعه در شهر خرم‌آباد

ردیف	نام استخر	تعداد نمونه	میزان کلر باقیمانده برحسب ppm	دما برحسب درجه سلیسیوس	میزان pH
۱	استخر ۱	۱۰	۲/۳(۲-۲/۸)	۲۸ (۲۷-۳۰)	۷/۵(۷/۳-۷/۸)
۲	استخر ۲	۱۰	۰/۸(۰/۵-۱)	۲۷ (۲۳-۲۸)	۷/۴(۷/۳-۷/۸)
۳	استخر ۳	۱۰	۱(۰/۵-۲)	۲۶(۲۵-۲۸)	۷/۴(۷/۴-۷/۸)
۴	استخر ۴	۱۰	۱/۶(۰/۵-۲/۵)	۲۹(۲۸-۳۰)	۷/۶(۷/۶-۷/۸)
۵	استخر ۵	۱۰	۲/۵(۲/۳-۲/۸)	(۲۷-۳۰)	۷/۷(۷/۶-۷/۸)
۶	استخر ۶	۱۰	۱(۱-۲/۵)	۲۶(۲۵-۲۹)	۷/۶(۷/۵-۷/۸)
۷	دریاچه	۸	۰	۶(۵-۹)	۷/۴(۷/۳-۷/۵)
۸	حوضچه ۱	۱۰	۰	۵(۴-۱۰)	۷/۴(۷/۳-۷/۵)
۹	حوضچه ۲	۶	۰	۷(۵-۶)	۷/۳(۷/۲-۷/۴)

جدول ۲: توزیع فراوانی آمیب‌های آزادزی در آب استخرها وحوضچه‌های شهر خرم‌آباددر سال ۹۵بر اساس روش PCRو کشت

نام استخر/حوضچه	نتیجه کشت					
	مثبت		منفی		جمع	
	PCR (درصد)فراوانی	کشت (درصد)فراوانی	PCR (درصد)فراوانی	کشت (درصد)فراوانی	فراوانی کشت/PCR	درصد
استخر ۱	۰(۰)	۴(۴۰)	۱۰	۶(۶۰)	۱۰	۱۰۰
استخر۲	۰(۰)	۰(۰)	۱۰	۱۰(۱۰۰)	۱۰	۱۰۰
استخر ۳	۹(۹۰)	۱۰(۱۰۰)	۱(۱۰)	۰(۰)	۱۰	۱۰۰
استخر ۴	۰(۰)	۰(۰)	۱۰(۱۰۰)	۱۰(۱۰۰)	۱۰	۱۰۰
استخر ۵	۲(۲۰)	۸(۸۰)	۸(۸۰)	۲(۲۰)	۱۰	۱۰۰
استخر ۶	۳(۳۰)	۴(۴۰)	۷(۷۰)	۶(۶۰)	۱۰	۱۰۰
دریاچه	۶(۷۵)	۸(۱۰۰)	۲(۲۵)	۰(۰)	۸	۱۰۰
حوضچه طبیعی ۱	۹(۹۰)	۱۰(۱۰۰)	۱(۱۰)	۰(۰)	۱۰	۱۰۰
حوضچه طبیعی ۲	۶(۱۰۰)	۶(۱۰۰)	۰(۰)	۰(۰)	۶	۱۰۰
مجموع	۳۵(۴۱/۷)	۵۰(۵۹/۳)	۴۹(۵۸/۳)	۳۴(۴۰/۵)	۸۴	۱۰۰



شکل ۱: الکتروفورز محصولPCR تعدادی از نمونه‌های آب استخرها وحوضچه‌های محیطی شهر خرم‌آباد (SM:100: مارکر100bp، C+:کنترل مثبت، None: کنترل منفی، S: شماره های ۲ تا ۱۱محصول PCR۱۰نمونه DNA آب که بطور تصادفی انتخاب شدند).

متغیرها و نتیجه کشت رابطه معنی‌داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) (جدول ۳).

تحلیل آماری نشان داد که میان نتیجه PCR و میزان کلر نمونه آب رابطه معنی‌داری وجود دارد(P=۰/۰۲۵) (جدول ۴).

توالی یابی و تعیین ژنوتیپ آکانتامبا

پس از تعیین توالی محصولات PCRوانجام بلاست مشخص شد که از ۳۵ نمونه که نتیجهPCR مثبت داشتند ۱۷نمونه (۴۸/۵۷٪) دارای ژنوتیپ T4بود و ۱۸نمونه (۵۱/۴۲٪) دارای

جدول ۳: رابطه نتیجه کشت ومیزان کلر موجود در نمونه آباستخرها و حوضچه‌های شهر خرم آباد در سال۹۵

نتیجه کشت	میزان کلر آب			ارزش P
	غیراستاندارد (درصد) تعداد	استاندارد (۳-۱ ppm) (درصد) تعداد	مجموع (درصد)تعداد	
منفی	۱(۱/۲)	۳۳(۳۹/۲۸)	۳۴(۴۰/۴۸)	۰/۰۰۷
مثبت	۱۵ (۱۷/۸۵)	۳۵(۴۱/۶۶)	۵۰ (۵۹/۵۲)	
مجموع	۱۶ (۱۹/۰۵)	۶۸ (۸۰/۹۵)	۸۴ (۱۰۰)	

جدول ۴: رابطه نتیجه PCR و میزان کلر موجود در نمونه آب استخرها و حوضچه های شهر خرم آباد در سال۹۵

نتیجهPCR	میزان کلر آب			Pارزش
	کلر غیر استاندارد (درصد)تعداد	کلراستاندارد (۳-۱ ppm) (درصد)تعداد	مجموع(درصد) تعداد	
منفی	۴(۴/۷۶)	۴۵(۵۳/۵۷)	۴۹(۵۸,۳۳)	۰/۰۲۵
مثبت	۱۲(۱۴/۲۸)	۲۳(۲۷/۳۸)	۳۵(۴۱/۶۶)	
مجموع	۱۶(۱۹/۰۵)	۶۸(۸۰/۹۵)	۸۴(۱۰۰)	

سایر ژنوتیپ‌های آکانتامبا هستندکه بدلیل فقدان امکانات، امکان تعیین ژنوتیپ بقیه نمونه ها میسر نشد.

بحث

نتایج حاصل ازمطالعه حاضر نشان می‌دهد که آمیب آزادزی آکانتامبا به میزان قابل توجهی در استخرها و حوضچه‌های آبی شهرخرم‌آباد شیوع دارد و تقریباً نیمی از این آمیب‌های جدا شده از نوع پاتوژن (ژنوتیپT4) می‌باشند. آکانتامبا از خانواده آمیب‌های آزادزی و یکی از شایع‌ترین تک‌یاخته‌های موجود در طبیعت است. این انگل فرصت‌طلب از محیط‌های مختلف جداشده و در ایران نیز با توجه به شیوع بیماری‌های ناشی از آن همچون کراتیت آکانتامبایی بسیار حائز اهمیت است [۶،۱۴]. براساس نتایج این مطالعه ۵۰ نمونه(۵۹/۵٪) ازآب استخرها و حوضچه‌های شهر خرم آباد در سال ۹۵ ازنظر وجود آمیب‌های آزادزی با روش کشت مثبت هستند.اینننتایج وفور بسیار زیاد آمیب‌های آزادزی را در نمونه‌های آبی موردمطالعه نشان داد. نتایج حاضر با یافته‌های مطالعه حسین-بیگی و همکاران (۱۳۹۱) که وفور آمیب‌های آزادزی آب پارک‌ها و میادین قزوین را ۸۰ درصد گزارش کردند [۱۳] و نیز مطالعه مسیبی و همکاران (۱۳۹۲) که وفور این آمیب‌ها را در منابع آبی اراک ۶۱/۱۱ درصد گزارش کردند [۱۴] همخوانی دارد.

مطالعه لاسجردی و همکاران (۲۰۱۱) وفور آمیب‌های آزادزی را در بخش‌های بستری بیماران دچار نقص سیستم ایمنی در تهران ۵۲/۹ درصد، قدر قدر جهرمی و همکاران (۱۳۹۱) وفور آمیب‌های آزادزی را در منابع آبی شیراز ۳۵ درصد ودر منابع آبی چاه نیز ۳۵ درصد گزارش کردند [۱۵،۱۶]. همچنین مطالعه گورنیک و همکاران (۲۰۱۳) بر روی آب‌های لوله‌کشی ترکیه شیوع آمیب‌های آزادزی را ۲۲ درصد و شوف و همکاران (۲۰۰۸) شیوع این آمیب‌ها را در آب‌های خانگی فلوریدا۱۹/۴ درصد گزارش کردند [۱۷،۱۸].

شناسایی جنس آکانتامبا تنها بر اساس ویژگی‌های مرفولوژی به دلیل تغییرات در شکل کیست به علت شرایط موجود در محیط کشت غیر قابل اعتماد بودهو طبقه‌بندی بر اساس ویژگی های مولکولی پایدارتر و صحیح‌تر است [۱۹-۲۱]. در مطالعه حاضر از روش PCR برای تشخیص وتایید آکانتامبا در نمونه‌های ایزوله شده از آب ها استفاده شد. نتایج PCR با پرایمرهای اختصاصی آکانتامبا نشان داد که از ۵۰ نمونه دارای نتیجه کشت مثبت، ۳۵ نمونه (۴۱/۷٪) ازنظر آکانتامبا مثبت هستند که این نتیجه بانتایجسایرمطالعات انجام شده همخوانی دارد.نمونه‌هایی که دارای نتیجه کشت مثبت بوده اما نتیجه PCR منفی دارند احتمالاً متعلق به سایر آمیب‌های آزادزی از جمله نگلریا، والکامفیا و بالاموثیا می باشند که تشخیص قطعی و افتراق آنها از آکانتامبا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی امکان پذیر است.

در مطالعات گذشته شیوع آکانتامبا در منابع مختلف محیطی در سرتاسر جهان موردمطالعه قرارگرفته است. شیوع آکانتامبا در منابع آب‌لوله‌کشی ترکیه ۲۲درصد [۲۱]، منابع محیطی ترکیه۲۱٪ [۲۲]، حمام‌های عمومی مجارستان ۶/۷ درصد [۲۲] نمونه‌های بالینی ژاپن ۵/۶٪ [۲۳]، منابع آب طبیعی هلند ۸٪ [۲۴]، آب‌های خانگی شهر سئول ۷/۷٪ [۲۵] وآب‌های خانگی فلوریدا ۲/۸٪ [۱۷]گزارش‌شده است. همچنین در نمونه‌های آب رودخانه در آمریکا، جامائیکا، آلمان و بلغارستان به ترتیب ۷٪، ۲۶/۴٪، ۷۹٪ و ۹۴٪ گزارش‌شده است[۲۶-۲۸]. وفور این آمیب در منابع آب خانگی نیکاراگوئه، مکزیک، برزیل، جامائیکا، اسپانیا و ژاپن به ترتیب ۲۱٪، ۲۲/۵٪، ۲۶/۳٪، ۳۶/۱٪، ۵۹/۵٪ و ۶۸/۷٪ گزارش‌شده است[۳۲-۲۹،۲۶،۱۰].

در ایران مطالعه ابراهیمی و همکاران (۱۳۹۲) بر روی نمونه های خاک پارک‌ها، مسیبی و همکاران (۱۳۹۲) بر روی منابع آبی اراک، افتخار و همکاران (۱۳۸۸) [۳۳] بر روی آب‌های سطحی تهران شیوع آکانتامبا را به ترتیب ۲۶/۹٪، ۶۱٪ و ۲۷/۳٪ گزارش کرده اند. نتایج این مطالعه در زمینه تعیینژنوتیپ جنس آکانتامبا

نشان داد که فراوانی ژنوتیپT4 (۴۸/۵۷٪) نسبت به سایر ژنوتیپ ها (۵۱/۴۲٪) تقریبا برابر است.به عبارت دیگر، تقریباً نیمی از ژنوتیپ‌های یافت شده درآب استخرها وحوضچه‌های طبیعی شهر خرم‌آباد ژنوتیپ پاتوژن هستند. تحلیل آماری یافته‌های حاصل از کشت و PCR حاکی از وجود رابطه معنی‌دار میان نتیجه کشت و PCR با میزان کلر بود. بعبارت دیگر میزان کلر موجود در آب در رشد آکانتامبا و مثبت شدن نتیجه کشت یا PCRنمونه‌های آب تاثیر معکوسدارد. همچنین ژنوتیپ‌های پاتوژن آکانتامبا مثل ژنوتیپ T4 در نمونه‌های آب استخرها و حوضچه‌های طبیعی شهر خرم آباد قدرت رشد بالایی دارند. وفور بالای ژنوتایپ T4 در نمونه‌های آب مورد بررسی حاکی از خطر بالقوه آن در ابتلا افرادی است که در تماس با این آبها قرار می گیرند و به تبع آن عوارض خطرناکی چون آنسفالیت گرانولوماتوز مزمن و کراتیت آکانتامبایی در افراد مستعد می‌تواند ایجاد شود. این مساله توجه مسئولان و متصدیان بهداشتی در جهت اطلاع رسانی مناسب و برنامه‌ریزی های آتی برای پیشگیری و حذف آلودگی آبها را می‌طلبد.

نتیجه‌گیری

مشاهده میزان قابل توجه آکانتامبا در نمونه‌های آب استخرها وحوضچه‌های شهر خرم‌آباد بیانگر این است که این آب‌ها یک منبع مناسب برای رشد وتکثیرآمیب‌های آزادزی از جمله آکانتامبا هستند.

باتوجه به پاتوژن بودن اغلب ژنوتیپ‌های جداشده امکان بروز عفونت‌های ناشی از آکانتامبا درافراد مستعد وجود داشته ولذا باید توجه مسئولین بهداشتی را به این مسئله جلب نمود.

از آنجا که بین میزان کلر باقیمانده و وفور آمیب ارتباط معنی‌دار وجود دارد لذا ضروری است متصدیان استخرها نسبت به کنترل میزان کلر باقیمانده توجه ویژه‌ای داشته باشند.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی همدان که بخشی از هزینه این تحقیق را تامین نمودند صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. همچنین جا دارد از گروه تخصصی بهداشت محیط شهرستان خرم‌آباد که هماهنگی‌های لازم جهت نمونه‌گیری از آب استخرها را انجام دادند تشکر و قدردانی به‌عمل آید. درضمن نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تضاد نمی‌باشد.

REFERENCES

1. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, et al. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris)*. 2012;**60**(6):399-405. PMID: 22520593 DOI: 10.1016/j.patbio.2012.03.002
2. Ramirez E, Campoy E, Matuz D, Robles E. Acanthamoeba isolated from contaminated groundwater. *J Eukaryot Microbiol*. 2006;**53**:S10-1. PMID: 17169014 DOI: 10.1111/j.1550-7408.2006.00156.x
3. Bunting LA, Neilson JB, Bulmer GS. Cryptococcus neoformans: gastronomic delight of a soil ameba. *Sabouraudia*. 1979;**17**(3):225-32. PMID: 394365
4. Marciano-Cabral F, Cabral G. Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*. 2003;**16**(2):273-307. PMID: 12692099
5. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*. 2004;**34**(9):1001-27. PMID: 15313128 DOI: 10.1016/j.ijpara.2004.06.004
6. La Scola B, Boyadjiev I, Greub G, Khamis A, Martin C, Raoult D. Amoeba-resisting bacteria and ventilator-associated pneumonia. *Emerg Infec Dis*. 2003;**9**(7):815-21. PMID: 12890321 DOI: 10.3201/eid0907.020760
7. 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**(Pt 8):755-9. PMID: 16014429 DOI: 10.1099/jmm.0.45970-0
8. Corsaro D, Venditti D. Phylogenetic evidence for a new genotype of Acanthamoeba (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res*. 2010;**107**(1):233-8. PMID: 20411277 DOI: 10.1007/s00436-010-1870-6
9. Khan NA. Pathogenesis of Acanthamoeba infections. *Microbial Pathogen*. 2003;**34**(6):277-85. PMID: 12782480
10. Lorenzo-Morales J, Monteverde-Miranda CA, Jiménez C, Tejedor ML, Valladares B, Ortega-Rivas A. Evaluation of Acanthamoeba isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann Agric Environ Med*. 2005;**12**(2):233-6. PMID: 16457479
11. Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of Acanthamoeba keratitis. *Trends Parasitol*. 2006;**22**(4):175-80. PMID: 16500148 DOI: 10.1016/j.pt.2006.02.004
12. Rezaian M, Bagheri F, Farnia S, Babai Z. Isolation of pathogenic amoeba (Naegleria and Acanthamoeba) From water sourcesand margin soils of reveirs and lakes in Kazerun. *J School Public Health Institute Public Health Res*. 2003;**1**(3):41-8.
13. Hosseinbigi B, Sahnesaraie MS, Alizadeh SA, 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. [Persian]
14. Mosayebi M, Ghorbanzadeh B, Eslamirad Z, Ejtehadifar M, Rastad B. The Isolation and detection of Acanthamoeba in rural water sources of Arak, Iran. *Med Lab J*. 2014;**7**(4):66-71. [Persian]
15. Ghadar S, Solhjoo K, 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):27.
16. 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. PMID: 21365453 DOI: 10.1007/s00436-011-2288-5
17. Shoff M, Rogerson A, Kessler K, Schatz S, Seal DV. Prevalence of Acanthamoeba and other naked amoebae in South Florida domestic water. *J Water Health*. 2008;**6**(1):99-104. PMID: 17998610 DOI: 10.2166/wh.2007.014
18. Górnik K, Kuźna-Grygiel W. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. *Ann Agric Environ Med*. 2004;**11**(2):233-6. PMID: 15627330
19. Dávila ÁM. Epidemiología y diagnóstico de amebas de vida libre implicadas en salud humana. [Doctoral Dissertation]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2015.
20. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 2015;**22**:10. PMID: 25687209 DOI: 10.1051/parasite/2015010
21. Jeong HJ, Yu HS. The role of domestic tap water in Acanthamoeba contamination in contact lens storage cases in Korea. *Korean J Parasitol*. 2005;**43**(2):47-50. PMID: 15951638
22. Kiss C, Barna Z, Vargha M, Török JK. Incidence and molecular diversity of Acanthamoeba species isolated from

public baths in Hungary. *Parasitol Res*. 2014;**113**(7):2551-7. PMID: 24781024 DOI: 10.1007/s00436-014-3905-x
23. Rahman MM, Yagita K, Kobayashi A, Oikawa Y, Hussein AI, Matsumura T, et al. Genetic characterization of clinical Acanthamoeba isolates from Japan using nuclear and mitochondrial small subunit ribosomal RNA. *Korean J Parasitol*. 2013;**51**(4):401-11. PMID: 24039282 DOI: 10.3347/kjp.2013.51.4.401
24. 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):2693-9. PMID: 24770720 DOI: 10.1007/s00436-014-3925-6
25. Yu HS, Kong HH, Kim SY, Hahn YH, Hahn TW, Chung DI. Laboratory investigation of Acanthamoeba lugdunensis from patients with keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;**45**(5):1418-26. PMID: 15111597
26. Lorenzo-Morales J, Coronado-Álvarez N, Martínez-Carretero E, Maciver SK, Valladares B. Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of Acanthamoeba in the Canary Islands, Spain. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;**77**(4):753-6. PMID: 17978083
27. Hoffmann R, Michel R. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *Inter J Hyg Environ Health*. 2001;**203**(3):215-9. PMID: 11279817 DOI: 10.1078/S1438-4639(04)70031-0
28. Ettinger MR, Webb SR, Harris SA, McIninch SP C, Garman G, Brown BL. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol Res*. 2002;**89**(1):6-15. PMID: 12474037 DOI: 10.1007/s00436-002-0707-3
29. Leiva B, Clasdotter E, Linder E, Winiecka-Krusnell J. Free-living Acanthamoeba and Naegleria spp. amebae in water sources of León, Nicaragua. *Rev Biol Trop*. 2008;**56**(2):439-46. PMID: 19256418
30. 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. PMID: 19565268 DOI: 10.1007/s00436-009-1528-4
31. Magliano AC, da Silva FM, Teixeira MM, Alfieri SC. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic Acanthamoeba sp. isolated from tap water in Brazil. *Exp Parasitol*. 2009;**123**(3):231-5. PMID: 19646440 DOI: 10.1016/j.exppara.2009.07.006
32. Bonilla-Lemus P, Ramírez-Bautista GA, Zamora-Muñoz C, del Rocío Ibarra-Montes M, Ramírez-Flores E, Hernández-Martínez MD. Acanthamoeba spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Exp Parasitol*. 2010;**126**(1):54-8. PMID: 19995560 DOI: 10.1016/j.exppara.2009.11.019
33. Eftekhar M, Nazem ME, Haghighi A, Sharifi K, Nochi Z, Athari A. Detection of Acanthamoeba from fresh water using polymerase chain reaction. *Res Med*. 2009;**33**(1):43-6.