دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی

جداسازی و تشخیص آمیب آزادزی آکانتامبا در منابع آب روستایی شهرستان اراک

مهدی مسیبی
استادیار انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

بهزاد قربان‌زاده
مربی انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

زهرا اسلامی راد
استادیار انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

مصطفی اجتهادی فر
دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

بهرام راستاد
دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

نویسنده مسئول: مهدی مسیبی

پست الکترونیک: m.mosayebi@arakmu.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۰۸۰۶۰۳۲۱

آدرس: گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

دریافت:۹۱/۱۲/۵
ویرایش پایانی:۹۲/۱/۲۸
پذیرش:۹۲/۲/۱

چکیده

زمینه و هدف: *گونه‌های آکانتامبا از دسته آمیب‌های آزاد زی هستند که می توان از تمامی محیط‌ها جدا کرد. گونه‌های مختلف آکانتامبا می‌توانند بیماری‌های مختلفی را درافراد سالم یا دارای نقص سیستم ایمنی ایجاد کنند. از جمله این بیماری‌ها می‌توان انسفالیت گرانولوماتوز آمیبی، کراتیت آکانتامبایی، زخم‌های پوستی وعفونت‌های نازو فارنشیال را نام برد. هدف از این مطالعه بررسی شیوع آمیب آکانتامبا در منابع آب روستاهای بخش مرکزی استان مرکزی بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی مقطعی ۵۴ نمونه آب از ۳۶ روستای اراک در استان مرکزی تهیه شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه توسط کاغذ فیلتر واتمن ۴۲ فیلتر شد. سپس کاغذ فیلتر شده در محلول page saline مخلوط و سانتریفیوژ گردید. در نهایت رسوب حاصل در محیط آگار غیرمغذی حاوی اشرشیاکلی کشت شد وپس از ۴ الی ۷ روز لام تهیه شده با گیمسا رنگ آمیزی شد.*

یافته‌ها: تعداد ۳۳ نمونه (۶۱/۱۱٪) از نظر کیست آکانتامبا مثبت و تعداد ۲۱ نمونه (۳۸/۸۹٪) نیز منفی گزارش شد. بهترین روش جهت کشت نمونه‌ها استفاده از محیط آگار غیرمغذی همراه با باکتری کشته شده بود. همچنین تکان دادن شدید کاغذهای فیلتراسیون نمونه های آب در محلول page saline و کشت رسوب حاصل از آن نتایج بهتری را از نظر تعداد کیست‌های بدست آمده نشان داد. در رنگ آمیزی گیمسا نیز بهترین نسبت استفاده شده رنگ ۱ به ۴۰ و مناسب ترین زمان جهت رنگ گرفتن کیست‌های موجود در محیط کشت حدود ۱۲ دقیقه بود.

نتیجه گیری: *درصد بالایی از منابع آب روستایی آلوده به این آمیب بوده و می‌تواند عامل مهمی در ایجاد آلودگی‌های انسانی باشد. به نظر می‌رسد نیاز است که روش‌های کنترلی موثری جهت جلوگیری از آلودگی منابع آب و پیشگیری از ابتلای انسانی گرفته شود.*

واژه‌های کلیدی: *آکانتامبا، آمیب آزادزی، استان مرکزی، روستا، منابع آب*

آدرس مقاله:
مسیبی م، قربان‌زاده ب، اسلامی راد ز، اجتهادی فر م ، راستاد ب" جداسازی و تشخیص آمیب آزادزی آکانتامبا در منابع آب روستایی شهرستان اراک" مجله علوم آزمایشگاهی، زمستان ۱۳۹۲ دوره هفتم(شماره۴):۶۶-۷۱

Archive of SID
.SID.ir

مقدمه

گونه‌های آکانتامبا از دسته آمیب‌های آزادزی می‌باشند که می‌توان آنها را از تمامی محیط‌ها جدا کرد. از جمله این محیط‌ها می‌توان منابع آب شهری، آب‌های سطحی، بطری-های آب معدنی، محلول‌های شست شوی چشم و عدسی های تماسی، خاک، گرد و غبار، فاضلاب، سیستم‌های تهویه و گرمایش هوا و حتی دستگاه‌های شست شوی دستگاه گوارش را نام برد (۱-۳). در شرایط طبیعی انگل به شکل آمیبی (تروفوزوئیت) دیده می‌شود که دارای پاهای خار مانند به نام آکانتوپودیا است و از باکتری‌ها تغذیه می-کند، ولی در شرایط نامساعد به شکل کیستی در می‌آید که نسبت به عوامل شیمیایی، مواد ضدعفونی کننده، عوامل فیزیکی، حرارت و خشکی مقاوم است(۳). گونه‌های مختلف آکانتامبا می‌توانند بیماری‌های مختلفی را در افراد سالم یا دارای نقص سیستم ایمنی ایجاد کنند. از جمله این بیماری‌ها می‌توان انسفالیت گرانولوماتوز آمیبی، کراتیت آکانتامبایی، زخم‌های پوستی و عفونت‌های دستگاه تنفس فوقانی (نازوفارنشیال) را نام برد(۵،۴). انسفالیت گرانولوماتوز آمیبی در دستگاه تنفسی تحتانی رخ داده و از طریق خون به سمت سیستم عصبی مرکزی گسترش می‌یابد. این شکل بیماری بیشتر در افراد دارای سیستم نقص ایمنی دیده می‌شود(۶،۴). زخم‌های پوستی و عفونت‌های نازوفارنشیال نیز به صورت منتشره و در افراد دارای نقص سیستم ایمنی دیده می‌شود(۱). افراد مبتلا به کراتیت آکانتامبایی افرادی با سیستم ایمنی کامل می‌باشند و حتی عفونت دوباره نیز می تواند رخ دهد(۵،۴). کراتیت آکانتامبایی اغلب پس از شنا کردن در آب‌های آلوده یا استفاده عدسی های تماسی چشم رخ می دهد. همچنین از دیگر عوامل خطر برای این بیماری استفاده از محلول‌های نمکی ساخته شده در خانه، محلول‌های پاک کننده آلوده عدسی های تماسی، ایجاد خراش قرنیه در اثر عوامل خارجی و تماس آب وهوای آلوده با عدسی های تماسی می‌باشد(۶،۵). از مسائل مهم دیگری که به دلیل گستردگی زیاد این آمیب دارای اهمیت می‌باشد همزیستی برخی بیماری زا باکتریایی و سایر میکروارگانیسم‌ها با این آمیب می‌باشد که با حضور در سیتوپلاسم این آمیب می‌توانند در مقابل عوامل ضد باکتریایی محافظت شوند. بیشترین مطالعات صورت گرفته در این رابطه در مورد باکتری *لژیونلا پونوموفیلا* می‌باشد که این باکتری می‌تواند در داخل گونه‌های مختلف آکانتامبا زندگی کند و رشد و تکثیر نماید و به این ترتیب در مقابل عوامل محیطی و غیر محیطی ضد باکتریایی محفوظ می‌ماند(۶،۴). با توجه به گستردگی فراوان این آمیب در محیط و ایجاد بیماری‌های مختلف به ویژه کراتیت آکانتامبایی که در ارتباط مستقیم با آب و محلول‌های مختلف می‌باشد و همچنین همزیستی برخی باکتری‌های بیماری زا با این آمیب و لزوم بررسی سلامت آب و آلاینده‌های زیستی، بر این اساس این طرح به منظور بررسی شیوع این انگل در منابع آب روستایی استان مرکزی انجام گرفت.

روش بررسی

این مطالعه تجربی مقطعی در ۳۶ روستا از روستاهای شهرستان اراک ، مرکز استان مرکزی در تابستان ۱۳۹۰ صورت پذیرفت. در این مطالعه جامعه هدف منابع آب روستایی بخش مرکزی شهرستان اراک (چشمه ها، قنات، آب لوله کشی) انتخاب شد و با توجه به نامشخص بودن میزان آلودگی در منطقه و عدم مطالعات پیشین در این خصوص، از ۵۰ درصد روستاهای اراک (۳۶روستا) به صورت خوشه‌ای نمونه گیری شد. در هر روستا براساس منابع آب مورد استفاده از هر منبع نمونه اخذ شده ۵۴ نمونه به دست آمد. شرط ورود نمونه ها به مطالعه منبع آبی بود که توسط اهالی روستاها برای شست شو و آشامیدن استفاده می‌شد.

محیط کشت

جهت کشت نمونه ها از محیط آگار غیر مغذی حاوی باکتری *اشریشیاکلی* استفاده شد. برای ساخت این محیط ۱/۵ گرم آگار با ۱۰۰ میلی لیتر محلول pages ameba saline حل گردید. مواد مورد نیاز جهت ساخت یک لیتر از

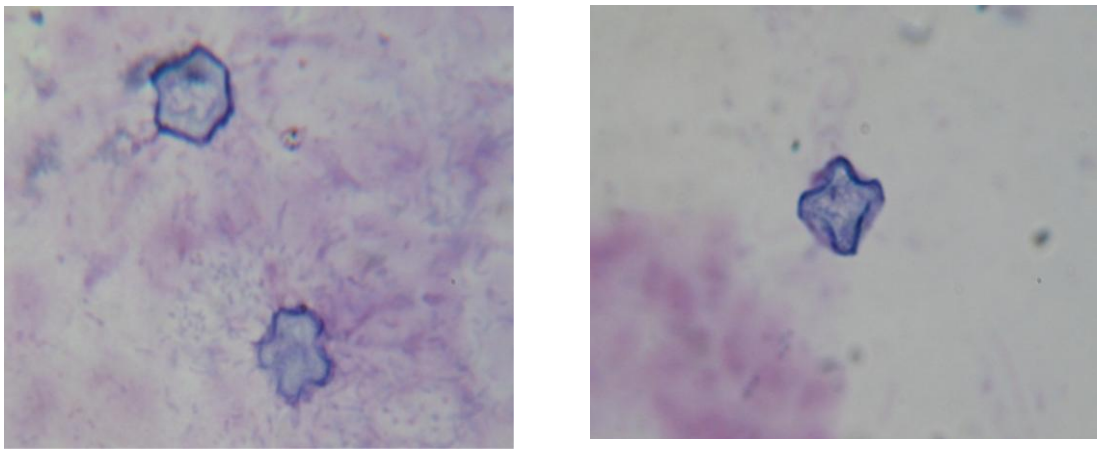
Archive of SID
www.SID.ir

این محلول شامل: فسفات سدیم ۰/۱۴۲ گرم، فسفات پتاسیم ۰/۱۳۶گرم، کلرید سدیم ۰/۱۲ گرم، سولفات منیزیم ۰/۰۰۴ گرم و کلرید کلسیم ۰/۰۰۴ گرم که با آب مقطر جمع را به یک لیتر می رسانم.

جهت یافتن مناسب ترین روش برای تشخیص انگل ابتدا نمونه‌هایی از مکان‌هایی که احتمال آلودگی در آنها بیشتر بود، تهیه شد. بر این اساس نمونه‌هایی از آب استخرهای میادین شهر اراک جمع آوری و از نمونه به ۴ قسمت تقسیم شده و به طور جداگانه با استفاده از سیستم فیلتراسیون فیلتر شد. تعدادی از فیلترها به صورت مستقیم روی دو نوع محیط کشت برده شد که یکی حاوی باکتری زنده و دیگری حاوی باکتری کشته شده بود. دسته‌ای دیگر از فیلترها ابتدا در محلول page saline تکان داده شده و سپس محلول حاصل سانتریفیوژ و کشت گردید. با مثبت بودن نتایج در این مرحله، پروتکل جداسازی و کشت مشخص و راه-اندازی گردید. بعد از هربار نمونه گیری از روستاها، نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال و مراحل کشت نمونه‌ها انجام پذیرفت. ابتدا نمونه خوب مخلوط شده و حدود ۱ لیتر از آن جهت فیلتراسیون استفاده شد. فیلتراسیون با استفاده از کاغذ فیلتر واتمن۴۲ و پمپ خلاء (ساخت شرکت میلیپور) صورت گرفت. پس از عبور نمونه از فیلتر، کاغذ فیلترها در پلیت حاوی page saline تکان داده شد. محلول حاصله به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها مایع رویی خالی شده و رسوب موجود در ته لوله بروی محیط آگار غیرمغذی حاوی باکتری *اشریشیاکلی* کشته شده ریخته و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۴ تا ۷ روز نگهداری شد. بعد از روز چهارم به طور روزانه از محیط‌های کشت لام تهیه شده و با استفاده از رنگ آمیزی گیمسا (نسبت ۱به ۴۰) و به مدت ۱۲ دقیقه رنگ آمیزی صورت گرفت و هر لام به مدت ۱۵ دقیقه بررسی و نتایج مثبت ثبت گردید. پوسارد و پونس (۴-۶) گونه‌های مختلف آکانتامبا را براساس شکل و اندازه کیست در سه گروه طبقه بندی کرده اند که از این مشخصه‌ها جهت تشخیص کیست‌های کشت یافته در محیط کشت استفاده گردید.

جدول۱- توزیع فراوانی آکانتامبا جداه شده از منابع آب

	تعداد	تعداد موارد مثبت	درصد
آب لوله کشی	۳۰	۸	۲۶/۶
آب چشمه	۱۰	۸	۸۰
آب قنات	۲	۲	۱۰۰
آب موتور خانه	۱۲	۸	٦٦/٦
جمع کل	٥٤	۳۳	٦١/١



شکل۱- کیست‌های آکانتامبا در رنگ آمیزی گیمسا. اندوکیست‌های ستاره‌ای و چندضلعی به رنگ آبی و اکتوکیست کم رنگ یا بی رنگ

www.SID.ir

یافته ها

بهترین روش جهت کشت نمونه‌ها استفاده از محیط آگار غیرمغذی همراه با باکتری کشته شده بود. همچنین کاغذهای فیلتر مخلوط شده در محلول page saline بهترین نتایج را در برداشت. از نظر رنگ آمیزی گیمسا بهترین نسبت استفاده شده ۱ به ۴۰ بود و مناسب ترین زمان جهت رنگ گرفتن کیست‌های موجود در محیط کشت حدود ۱۲ دقیقه بود. کیست‌های آکانتامبا در استفاده از رنگ آمیزی گیمسا به رنگ آبی در می‌آید. به این صورت که اندوکیست ستاره‌ای یا مثلثی آکانتامبا به رنگ آبی درآمده و اکتوکیست به صورت یک هاله بی رنگ و یا بسیار کم رنگ مشاهده می‌شود(شکل ۱). بیشترین شیوع آکانتامبا در آب قنات ها دیده شد و هر دو نمونه آلوده بودند و کمترین آلودگی در آب های لوله کشی مشاهده شد.

بحث

نتایج بدست آمده نشان داد که درصد بالایی از منابع آب روستایی، آلوده به این آمیب بوده و این می‌تواند عامل مهمی در ایجاد آلودگی‌های انسانی باشد. بنابراین لازم به نظر می‌رسد که روش‌های کنترلی موثری جهت جلوگیری از آلودگی منابع آب گرفته شود. همچنین همزیستی برخی باکتری های بیماری زا با این انگل از جمله *لژیونلا پونوموفیلا* ایجاب می‌کند تا کنترل دقیقی بر روی منابع آب صورت گیرد (۷،۶). در مطالعه‌ای که توسط باقری و همکاران بر روی آب آشامیدنی بیمارستان‌های ۱۳ شهر مختلف ایران صورت گرفت، تعداد ۹۴ نمونه از نظر آکانتامبا مورد بررسی قرار گرفت که ۴۵ مورد (۴۸٪) از این نمونه‌ها آلوده بود که بیشترین آلودگی مربوط به بیمارستان-های شهر مشهد با ۸۳ درصد آلودگی بود (۱). در مطالعه‌ای که توسط افتخار و همکاران با عنوان شیوع آکانتامبا در آب‌های سطحی شهر تهران انجام شد، از مجموع ۲۲ نمونه جمع آوری شده ۱۳ نمونه(۵۹/۱٪) آنها در کشت منوگزنیک از لحاظ شکل ظاهری کیست‌های بدست آمده، آکانتامبا تشخیص داده شدند که با این مطالعه همخوانی دارد(۹). در مطالعه دیگری که توسط رضاییان و همکاران از آب و خاک حاشیه رودخانه‌ها و دریاچه‌های مختلف کازرون صورت گرفت، از مجموع ۳۵۴ نمونه آب و خاک رودخانه‌ها و دریاچه‌های پریشان و دشت ارژن ۱۰ مورد آکانتامبا و ۳ مورد نگلریا (آمیب آزادزی ساکن آب‌های گرم) جدا شد(۸). در مطالعه دیگری که توسط Lekkla و همکاران انجام شد آمیب‌های آزادزی مقاوم به حرارت، شامل نگلریا و آکانتامبا، چشمه‌های آب طبیعی روستایی بیش از ۱۳ استان کشور تایلند را آلوده ساخته بودند. دمای این آب‌های گرم حدود ۲۸ تا ۵۶ درجه سانتی گراد و PH آنها ۶ تا ۸ بود. در این مطالعه ۳۸/۲ درصد نمونه ها مثبت بودند(۹). در مطالعه Niyyati و همکاران، پس از فیلتراسیون نمونه‌های آب، کاغذ فیلتر را به طور مستقیم بر روی محیط کشت قرار داده بودند ولی در این مطالعه بهترین روش که جهت کشت نمونه‌ها استفاده شد، شیک کردن کاغذ فیلتر در پلیت حاوی page saline بود که پس از آن محلول فوق را با دور پایین سانتریفوژ کرده و رسوب حاصله کشت داده شد(۱۰) که از این نظر با مطالعه افتخار و سایر مطالعات همخوانی داشت(۱۲،۱۱،۷). در مطالعه‌ای که توسط رضاییان و همکاران بر روی منابع محیطی مختلف (خاک، آب آشامیدنی، آب استخرها، گرد و غبار و مدفوع گاو) شهر تهران صورت گرفت، مشاهده گردید که ۳۷ (۴۶/۲۵ درصد) نمونه از ۸۰ نمونه جمع‌آوری شده آلوده به آکانتامبا می‌باشند که از میان این نمونه‌ها تمامی منابع خاک آلوده گزارش گردید و ۳۳ درصد منابع آب و ۴۶ درصد منابع حاصل از گرد و غبار نیز آلوده گزارش گردید(۱۳).

نتیجه گیری

درصد بالایی از منابع آب روستایی آلوده به این آمیب بوده و می‌تواند عامل مهمی در ایجاد آلودگی‌های انسانی باشد. به نظر می‌رسد نیاز است که روش‌های کنترلی موثری جهت جلوگیری از آلودگی منابع آب و پیشگیری از ابتلای انسانی مدنظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۵۴۸ معاونت پژوهش و تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد. بدین وسیله

Archive of SID
www.SID.ir

از معاونت محترم آموزش و تحقیقات دانشگاه و کارکنان امور آب و فاضلاب روستایی استان مرکزی که در انجام هر چه بهتر این طرح ما را یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Bagheri HR, Shafiei R, Shafiei F, Sajjadi SA. *Isolation of Acanthamoeba Spp. from Drinking Waters in Several Hospitals of Iran.* Iranian J Parasitol. 2010; 5(2): 19-25.

2. Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Martínez E, Khoubbane M, Artigas P, Periago MV, et al. *Acanthamoeba isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt*. Acta Tropica. 2006; 100(1-2): 63-69.

3. 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.* Experimental Parasitology. 2009; 123(3): 231-235.

4. Hsu BM, Ma PH, Liou TS, Chen JS, Shih FC. *Identification of 18s ribosomal DNA genotype of Acanthamoeba from hot spring recreation areas in the central range, Taiwan.* Journal of Hydrology. 2009; 367(3-4): 249-254.

5. Bonilla-Lemus P, Ramírez-Bautista GA, Zamora-Muñoz C, Ibarra-Montes Mdel R, 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*. Experimental Parasitology. 2010; 126(1): 54-58.

6. Huang SW, Hsu BM. *Isolation and identification of Acanthamoeba from Taiwan spring recreation areas using culture enrichment combined with PCR*. Acta Tropica. 2010; 115(3): 282-287.

7. Eftekhar M, Nazemalhosseini Mojarad A, Haghighi A, Sharifi Sarasiabi Kh, Nochi Z, Athari A. *Detection of Acanthamoeba from fresh water using polymerase chain reaction.* Journal of the Faculty of Medicine. 2009; 33(1): 43-46.[Persian]

8. Rezaian M., Bagheri F., Farnia Sh., Babai Z. ,Isolation of Pathogenic Ameaba (Negleria and Acanthamoeba) from water Sources And Margin Soils of Reveirs and lakes in KazerunJournal of School of Public Health and Institute of Public Health Research. 2003; 1(3): 41-48. [Persian]

9. Lekkla A, Sutthikornchai Ch, Bovornkitti S, Sukthana Y. *Free-living Ameaba contamination in natural hot spring in Thailand*. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2005; 36(4): 5-9.

10. Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Mohebali M, Maghsood AH, et al. *Genotyping of Acanthamoeba isolates from clinical and environmental specimens in Iran.* Experimental Parasitology. 2009; 121(3): 242-245.

11. Khan NA. *Pathogenesis of Acanthamoeba infections*. Microbe Pathog. 2003; 34(6): 277-85.

12. Cao Z, Jefferson DM, Panjwani N. *Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanism of Acanthamoeba*. J Biol Chem. 1998; 273(5): 15838-15845.

13. Rezaeian M, Niyyati M, Farnia Sh, Motevalli Haghi A. *Isolation of Acanthamoeba Spp. from Different Environmental Sources*. Iranian J Parasitol. 2008; 3(1): 44-47.

Archive of SID