



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

Mohammad Hossein Golestani<sup>1</sup>, Sima Rasti<sup>1</sup>, Hossein Hooshyar<sup>1</sup>, Mahdi Delavari<sup>1</sup>, Seyed Gholam Abbas Mousavi<sup>2</sup>, Leila Iranshahi<sup>3</sup>

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](mailto:Rasti_s@yahoo.com)

Use your device to scan  
and read the article online



### Abstract

**Background and Aims:** *Acanthamoeba*, the causative agent of granulomatous amoebic 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

جداسازی آمیب‌های آزادی و شناسایی مولکولی *آکانتامبا* از آب‌های راکد کاشانمحمدحسین گلستانی<sup>۱</sup>، سیما راستی<sup>۱</sup>، حسین هوشیار<sup>۱</sup>، مهدی دلوری<sup>۱</sup>، سید غلام عباس موسوی<sup>۲</sup>، لیلا ایرانشاهی<sup>۳</sup>

۱. گروه انگل‌شناسی و فارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲. گروه آمار و بهداشت، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۳. گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

## چکیده

## اطلاعات مقاله

## تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۳

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۲۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۴/۰۹

موضوع: انگل‌شناسی بالینی

IJMM1397;12(2): 125-132

## نویسنده مسئول:

## سیما راستی

گروه انگل‌شناسی و فارچ‌شناسی،

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی

کاشان، کاشان، ایران

تلفن: ۰۳۱-۵۵۴۱۱۱۲

## پست الکترونیک:

Rasti\_s@yahoo.com



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

**مواد و روش کار:** در این مطالعه توصیفی، ۱۳۸ نمونه آب راکد از مساجد و پارک‌های کاشان جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها پس از عبور دادن از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی و کشت در آگار غیرمغذی از نظر آمیب آزادی بررسی شدند. برای شناسایی مولکولی *آکانتامبا* از واکنش زنجیره‌های پلی‌مراز و پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. پس از تکثیر قطعه ۴۹۰bp و تعیین توالی نوکلئوتیدی، ژنوتایپ ۱۰ ایزوله *آکانتامبا* شناسایی شد. pH، دما، فصل نمونه‌گیری و نتایج در SPSS نسخه ۱۶ ثبت و تحلیل شد.

**یافته‌ها:** ۸۸/۴ درصد از نمونه‌ها آلوده به آمیب آزادی بودند که با استفاده از PCR ۵۹/۴ درصد آنها به‌عنوان *آکانتامبا* شناسایی و تأیید شدند. از میان نمونه‌های تأیید شده ۸۰ درصد مربوط به ژنوتایپ *آکانتامبا* T4 و ۲۰ درصد T2 بودند. بین فصول نمونه‌گیری و آلودگی با آمیب آزادی ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ( $P = 0/01$ ). بیشترین میزان آلودگی آب راکد به آمیب آزادی و *آکانتامبا* در pH۷ مشاهده شد. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین pH و دما با آلودگی آمیب آزادی و *آکانتامبا* مشاهده نشد.

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

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

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

## مقدمه

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 شست‌وشودهنده 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

جنس‌های گوناگون آمیب‌های آزادی 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 همه آمیب‌های آزادی بالقوه بیماری‌زا هستند؛ اما جنس‌های *آکانتامبا*، نگلریا و بالاموتیا بیشتر در انسان و دیگر حیوان‌ها، مننگوانسفالیت آمیبی، بیماری‌های چشمی و پوستی ایجاد می‌کنند (۱، ۲). گونه‌های *آکانتامبا*، رایج‌ترین تک‌یاخته‌های آمفی‌زوتیک هستند که معمولاً

## جداسازی آمیب‌های آزادزی

## الف) فیلتراسیون نمونه‌ها:

هریک از نمونه‌های آب جمع‌آوری شده ابتدا از فیلترهای ۰/۴۵ میکرون نیتروسولوز (شرکت بیوتک آلمان) و با استفاده از پمپ خلاء AEI (ساخت انگلستان) عبور داده شدند. برای جلوگیری از آلودگی نمونه‌ها، پس از فیلتر کردن هر یک از نمونه‌ها، دستگاه شسته و خشک شد.

## ب) کشت:

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

تشخیص *آکانتامبا* با PCR:

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

محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز و با ترانس لومیناتور بررسی شد. مشاهده باند اختصاصی ۴۹۰bp نشان‌دهنده وجود *آکانتامبا* در نمونه و مثبت بودن آلودگی در نظر گرفته شد.

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 دهه گذشته به‌شکل چشم‌گیری افزایش یافته است (۷). کراتیت *آکانتامبا* عفونی حاد است و قرنیه را درگیر می‌کند. این بیماری در افرادی که سیستم ایمنی نرمال هم دارند ایجاد می‌شود و از راه وارد شدن تروما به قرنیه و یا به‌دلیل رعایت نکردن اصول بهداشتی در استفاده از لنزهای تماسی رخ می‌دهد (۸). در ایران نیز نمونه‌های تشخیص داده شده در دانشکده 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).

منطقه 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 آزادی 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)، مطالعه حاضر با هدف شناسایی آمیب‌های آزادی و تعیین ژنوتایپ‌های *آکانتامبا* در کاشان انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

## جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه مقطعی، در بازه 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 ۵۰۰ میلی‌لیتر در بطری‌های درپوش‌دار استریل جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کاشان از نظر آمیب‌های آزادی و *آکانتامبا* بررسی شد. ارتباط عوامل محیطی نظیر دما، pH و فصل با آمیب آزادی و *آکانتامبا* بررسی شد.

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 ۲۶-۳۰ درجه سلسیوس مشاهده شد که به ترتیب 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 ایزوله آکانتامبا تعیین توالی شد که ۸ ایزوله (۸۰ درصد) ژنوتیپ T4 و ۲ ایزوله (۲۰ درصد) T2 بودند. میزان مشابهت توالی نوکلئوتیدها با سایر ایزوله‌ها ۹۸-۱۰۰ درصد بود. لازم به توضیح است ژنوتیپ‌های T4 و T2 بیماری‌زا هستند. ۱۰ ایزوله آکانتامبا در بانک ژن، با شماره‌های زیر ثبت شدند. شماره ثبت ژن‌ها و ژنوتیپ:

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

### تعیین توالی نوکلئوتیدهای محصول PCR ( PCR Sequencing):

محصول PCR به دست آمده از ۱۰ نمونه جدا شده از آب راکد برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی نمونه‌های ارسال شده، هریک از توالی‌ها در پایگاه NCBI و با استفاده از نرم‌افزار بلاست ارزیابی شدند. در ادامه با توجه به میزان تشابه هریک از توالی‌های نوکلئوتیدی با توالی‌های استاندارد و ثبت شده در بانک ژن این پایگاه، ژنوتیپ هریک از نمونه‌ها، مشخص شد. همچنین پس از تعیین و تأیید ژنوتیپ ۱۰ ایزوله آکانتامبا، جزئیات کامل هریک در بانک ژن NCBI ثبت شد.

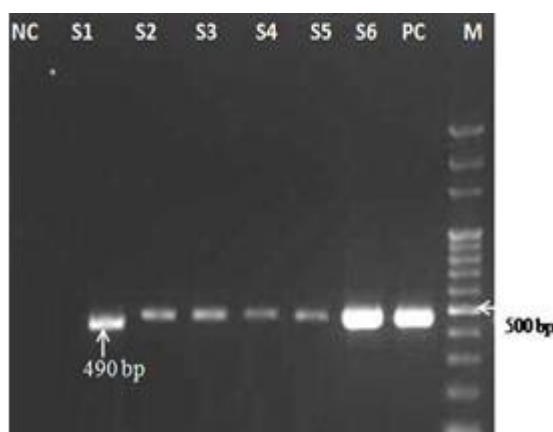
### تجزیه و تحلیل اطلاعات:

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

### یافته‌ها

بر اساس نتایج بررسی حاضر، از ۱۳۸ نمونه آب‌های راکد بررسی شده 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).

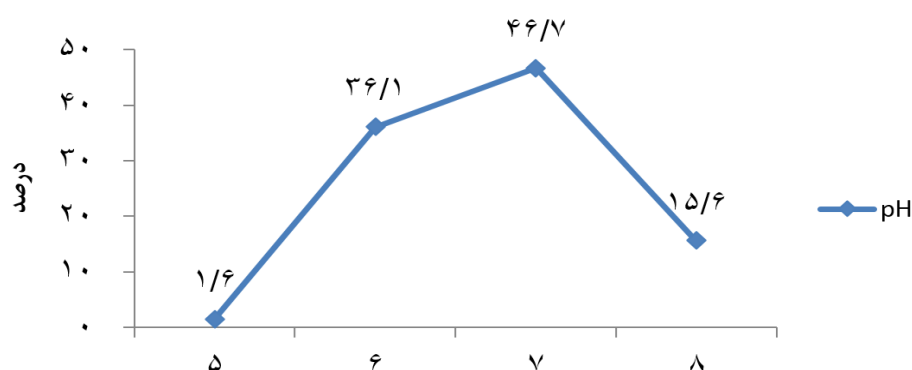
بیشترین میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی و آکانتامبا در آب جمع‌آوری شده از مساجد به ترتیب ۳۳ نمونه (۹۷/۱ درصد) و



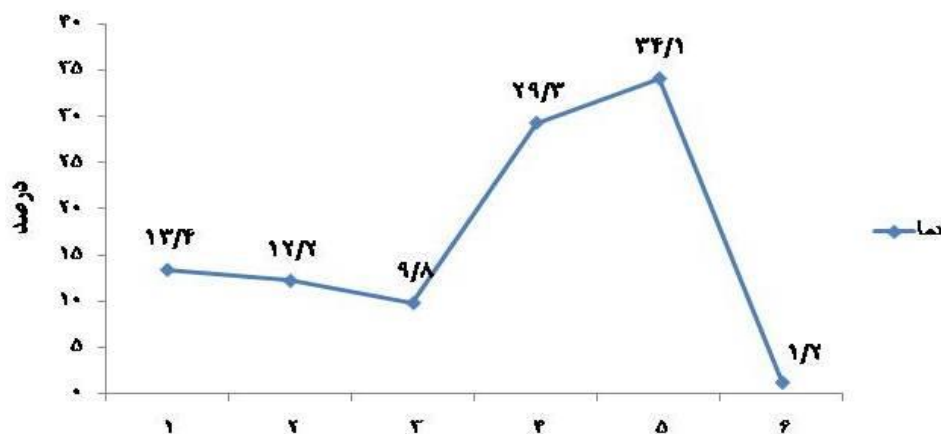
شکل ۱. الکتروفورز قطعه تکثیر یافته با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آکانتامبا JDP1 , JDP2 بر ژل آگاروز ۱/۵ درصد در آب‌های راکد کاشان. M مارکر وزنی ۱۰۰bp، NC کنترل منفی، PC کنترل مثبت، S1-S6 نمونه‌های مثبت آکانتامبا

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

محل نمونه‌گیری	آکانتامبا		آمیب آزادزی		تک‌یاخته
	مثبت تعداد (درصد)	منفی تعداد (درصد)	مثبت تعداد (درصد)	منفی تعداد (درصد)	
مسجد	۲۳ (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: ۲۰-۱۶°C: ۴، ۴: ۲۵-۲۱°C: ۵، ۵: ۳۰-۲۶°C: ۶، ۶: ۳۵-۳۱°C

نمودار ۲. توزیع آلودگی آب‌های راکد به آکانتامبا برحسب دما

Aghajani و همکاران (۲۰۱۶) انجام شده است، آلودگی به آمیب‌های آزادزی را در آب پارک‌ها و میدان‌های قزوین و سیستان به ترتیب ۸۰ درصد و ۸۸ درصد گزارش شد (۱۱-۱۰). نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات بیان شده همخوانی دارد و وفور بسیار زیاد آمیب‌های آزادزی را در نمونه آب‌های راکد نشان می‌دهد.

#### بحث

با ارزیابی نمونه‌های آب راکد جمع‌آوری شده از سطح شهر کاشان، مشخص شد که حدود ۸۸ درصد از آب‌های راکد سطح شهر به آمیب‌های آزادزی آلوده‌اند (۹۳۷/۰ - ۸۳۱/۰ CI). در مطالعه‌ای که از سوی Hosseinbigi (۲۰۱۲) و همکاران و نیز

نقص ایمنی تهران T4 و T5 (۲۰) و در نمونه‌های بالینی ژاپن به ترتیب T4 و T3 و T15 شایع‌ترین ژنوتیپ‌های جدا شده بودند (۲۱).

مطالعات مختلف بیانگر این است که بیشترین ژنوتیپ جدا شده از منابع محیطی و نمونه‌های بالینی ژنوتیپ T4 است (۲۲). در مطالعه 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) و گرانولوماتوز پوستی *آکانتامبا* (۲۵) ایجاد کنند. همچنین مرگ‌ومیر ناشی از آنسفالیت آمیبی مرتبط با این ژنوتیپ گزارش شده است (۲۶). کراتیت *آکانتامبا* ممکن است افرادی را حتی با ایمنی سالم و کارآمد گرفتار کند و در نهایت سبب کاهش بینایی و کوری فرد شود (۲۲-۲۳).

بر پایه نتایج به دست آمده بین آلودگی به آمیب آزادزی و فصل، ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ( $P = 0/01$ ) (به شکلی که بیشترین میزان آلودگی به *آکانتامبا* در تابستان وجود داشت ( $P = 0/38$ ). همچنین بیشترین آلودگی به آمیب آزادزی و *آکانتامبا* در آب‌هایی با دمای ۳۰-۲۶ درجه سلسیوس مشاهده شد که با توزیع آلودگی فصلی هماهنگی دارد. در مطالعه 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

بر اساس نتایج این مطالعه و مقایسه با دیگر مطالعات گزارش شده، 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 بیماری‌زایی این ژنوتیپ و به‌ویژه نقش آن در بروز کراتیت آمیبی و آنسفالیت گرانولوماتوزی آمیبی، به‌سازی محیط و آموزش بهداشت برای کنترل و پیشگیری آلودگی پیشنهاد می‌شود.

اما در مطالعه Solhjoو و همکاران (۲۰۱۲) میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی در منابع آبی شیراز ۳۵ درصد گزارش شده است که کمتر از نتایج مطالعه حاضر است (۱۲). همچنین میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی را در آب‌های لوله‌کشی ترکیه ۲۲ درصد و در آب‌های خانگی فلوراید ۱۹/۴ درصد گزارش کرده‌اند (۱۳، ۱۴). طبق مطالعات موجود شیوع آمیب‌های آزادزی در آب‌های خانگی و تصفیه شده نسبت به آب‌های راکد کمتر است. در آب‌های لوله‌کشی به دلیل تماس نداشتن آب با عوامل آلوده‌کننده و نیز ضد عفونی کردن آب با کلر که باعث انهدام ترفوزوئیت آمیب می‌شود، سطح آلودگی کمتر است. در مطالعه اخیر میزان آلودگی آب‌های راکد به *آکانتامبا* ۵۹/۴ درصد گزارش شد (۰/۹۳۷ - ۰/۸۳۱). همچنین میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* در آب مساجد ( $P = 0/001$ ) بیشتر از پارک‌ها ( $P = 0/74$ ) بود. لازم به توضیح است که عادت غیربهداشتی کشیدن آب وضو به بینی، احتمال ورود این انگل‌ها و احتمال بروز بیشتر آنسفالیت گرانولوماتوز آمیبی می‌شود.

محققان سایر مطالعات انجام شده 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. همه 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 بررسی شده، شرایط محیطی و آب‌وهوایی، تفاوت روش استخراج DNA و نوع پرایمر استفاده شده باشد. *آکانتامبا* در آب‌های حوضچه‌های میدان‌ها، پارک‌ها و مسجدها نسبت به آب‌های تصفیه شده لوله‌کشی خانگی بیشتر است. دلایل میزان زیاد آلودگی آب‌های راکد به *آکانتامبا* ممکن است به عواملی مثل مقاومت به حرارت، اسمولاریته بالا و همچنین رشد در ۱۲ - ۴ pH وابسته باشد (۱۰، ۷). در کاشان به دلیل 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 مطالعه Lasjerdi و همکاران (۲۰۱۱) روی بیماران

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## سیاسگزاری

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

## 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> PMID: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 PMID:PMC2916629
7. Edrissian G, Rezaeian M, Mohebbali M, Keshavarz H. *Medical Protozoology*. 2nd Ed. Tehran: Tehran University of Medical Sciences; 2015. PMID: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 PMID: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 Parazitoloj 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, Haghghi A, Niyati M, Eftekhari 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. Niyati 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, Niyati 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](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