جداسازی و شناسایی مولکولی آکانتامبا در آب‌های راکد سطحی شهر قزوین

بهرام حسین‌بیگی* دکتر مهرزاد سرائی صحنه‌سرائی** صفرعلی علیزاده*** دکتر سیما راستی****
محمد افتخار***** نادر خسروشاهی*** دکتر حسین هوشیار******

* کارشناس ارشد انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
** استادیار انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
*** کارشناس ارشد میکروب‌شناسی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
**** استادیار انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کاشان
***** کارشناس ارشد انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
****** دانشیار انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

آدرس نویسنده مسؤول: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی، تلفن ۶-۵۵۵۰۰۲۱-۰۳۶۱
Email: hooshyar4@yahoo.com , hoshyar_h@kaums.ac.ir
تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۱۲

چکیده

زمینه: افزایش موارد آکانتامبیازیس در دهه‌های اخیر سبب شده است که بررسی محیطی این تک‌یاخته مورد توجه قرار گیرد. یکی از منابع مهم احتمالی آلودگی‌های انسانی، آب‌های راکد سطحی است.

هدف: مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی مولکولی آکانتامبا در آب‌های راکد و سطحی شهر قزوین انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی تعداد ۴۰ نمونه آب راکد از پارک‌ها و میادین مختلف شهر قزوین در پاییز ۱۳۸۹ جمع‌آوری و نمونه‌ها از فیلترهای نیتروسلولز ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شدند. عناصر باقی‌مانده روی فیلترها در محیط کشت آگار غیرمغذی کشت داده شدند. محیط‌های کشت از نظر تروفوزوئیت و کیست آمیب‌های آزادزی به روش میکروسکوپی آزمایش شدند سپس ترفوزوئیت‌های حاصل از کشت‌های مثبت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس آکانتامبا به روش PCR آزمایش شدند.

یافته‌ها: از۴۰ نمونه مورد بررسی به روش کشت، در ۳۲ نمونه (۸۰٪) آمیب‌های آزادزی رشد و تکثیر یافتند. با استفاده از روش PCR، در ۱۴ نمونه مثبت (۴۳/۸٪) گونه‌های آکانتامبا تشخیص داده شد که باندی اختصاصی حدود ۵۰۰bp نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به وجود آکانتامبا در آب‌های راکد و سطحی شهر قزوین، ضروری است پزشکان و دست‌اندرکاران بهداشتی منطقه به نقش احتمالی این آب‌ها در انتقال آکانتامبا و بیماری‌های ناشی از آن توجه کنند.

کلیدواژه‌ها: آکانتامبا، آب راکد سطحی، آمیب، پی‌سی‌آر

Archive of SID

مقدمه:

آکانتامبا جنسی از آمیب‌های آزادزی است که انتشار جهانی دارد و به طور فراگیر در آب، خاک، هوا، فاضلاب و سایر محیط‌ها پراکنده است.[1] این تک یاخته گونه‌های مختلفی دارد که برخی از آن‌ها برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند. گونه‌های آکانتامبا به دو شکل تروفوزوئیت و کیست مشاهده می‌شوند. کیست در شرایط نامساعد محیطی تشکیل و سبب بقا و تداوم حیات این تک یاخته در طبیعت می‌شود. کیست در مقابل گندزداهای مورد استفاده برای ضدعفونی کردن انواع وسایل و تجهیزات پزشکی و همچنین کلرینه کردن آب و ضدعفونی کردن سیستم‌های آب بیمارستان‌ها مقاوم است.[2-4]

www.SID.ir

گونه‌های مختلف آکانتامبا از محیط‌های مختلف جدا شده‌اند شامل: خاک، آب، آب معدنی داخل بطری، استخرهای شنا، یونیت‌های دندان‌پزشکی، دستگاه‌های خنک‌کننده و تهویه مطبوع، دستگاه دیالیز، گرد و غبار هوا، محیط‌های کشت، متعلقات لنزهای تماسی، ترشحات گوش و بینی و مخاط حلق بیماران با ناراحتی‌های تنفسی.[۱] علی‌رغم انتشار بسیار گسترده گونه‌های آکانتامباهای بیماری‌زا، گزارش‌های محدودی درباره بیماری ناشی از آن‌ها در دست است. اکثر گزارش‌ها مربوط به سال‌های اخیر و پس از رایج شدن استفاده از لنزهای تماسی است. آکانتامبیازیس تظاهرات مغزی، پوستی، ریوی و چشمی دارد که سه مورد اول به طور عمده در بیماران دچار اختلال ایمنی اتفاق می‌افتد. عفونت مغزی سبب انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز می‌شود که عارضه‌ای مزمن و کشنده است.[۵] در این موارد، آمیب ممکن است از طریق اپی‌تلیوم بویایی، ریه، لزیون‌های پوستی یا مخاط وارد خون شود و به مغز گسترش یابد. آکانتامبیازیس پوستی (cutaneous acanthamoebiasis) شایع‌ترین تظاهر عفونت‌های آکانتامبایی در مبتلایان به ایدز شناخته شده است که می‌تواند ضایعه‌های پوستی وسیعی ایجاد کند.[۶] پنومونی آکانتامبایی با فراوانی کم‌تر از دو نوع قبلی مشاهده می‌شود. این آمیب ممکن است به استخوان هجوم ببرد و سبب استئومیلیت شود.[۷] عارضه اصلی این آمیب در عفونت‌های چشمی،کراتیت آکانتامبایی است که به طور عمده در افراد جوان و دارای کفایت عملکرد ایمنی گزارش شده است و به طور معمول در افرادی اتفاق می‌افتد که آسیب جزئی در قرنیه دارند یا از لنزهای تماسی به خصوص لنزهای آرایشی و رنگی استفاده می‌کنند.[۸]

ترفوزوئیت‌های آکانتامبا در طبیعت به عنوان مخزنی برای انواع باکتری‌های پاتوژن نظیر گونه‌های لژیونلا، هلیکوباکتر پیلوری، ویبریو کلرا، مایکوباکتریوم اویوم و لستریا مونوسیتوژنز شناخته شده‌اند و سبب حفظ، تکثیر و انتقال این عوامل باکتریایی می‌شوند.[۱] زیستگاه معمول آکانتامبا و این باکتری‌ها آب است و در بین انواع محیط‌های آبی، آب‌های راکد سطحی، مناسب‌ترین محیط برای بقا، رشد و تکثیر آمیب هستند. با توجه به این که آب‌های راکد یک منبع احتمالی انواع عفونت‌های انسانی هستند، مطالعه آن‌ها از نظر آلودگی به آکانتامبا به لحاظ بهداشت، حفظ و تأمین سلامت افراد جامعه بسیار ارزشمند است.

شناسایی آکانتامبا به طور معمول از طریق روش مستقیم میکروسکوپی نمونه‌ها یا کشت آن‌ها در محیط کشت و براساس خصوصیات ساختاری کیست‌های آن است. این روش به علت تأثیر شرایط کشت با محدودیت‌هایی همراه است. در سال‌های اخیر روش مولکولی Polymerase (PCR) Chain Reaction این مشکل را تا حد زیادی برطرف کرده و آزمون تأییدی مناسبی برای افتراق آکانتامبا از سایر آمیب‌های آزادزی است. PCR نمونه‌ها با تکثیر قطعه‌ای از ژن 18S rRNA به عنوان روشی اختصاصی برای شناسایی جنس آکانتامبا توصیف شده است.[۹] با توجه به عدم وجود اطلاعات در مورد آمیب‌های آزادزی در قزوین، مطالعه حاضر به منظور جداسازی و شناسایی مولکولی آکانتامبا در آب‌های راکد و سطحی این شهر انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی، نمونه‌برداری طی فصل پاییز ۱۳۸۹ از آب‌های راکد میدان‌ها و آب نماهای پارک‌های شهر قزوین انجام شد. تعداد ۴۰ نمونه ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتری آب از مکان‌های مختلف در داخل ظرف‌های استریل و عاری از آلودگی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین منتقل شدند.

برای جداسازی آکانتامبا از آب‌های راکد از روش فیلتراسیون به کمک پمپ خلاء استفاده شد. نمونه‌های آب به طور جداگانه از فیلتر نیتروسلولز با منافذ ۰/۴۵ میکرون عبور داده شدند (با این روش آمیب‌ها از فیلتر عبور

Archive of SID

www.SID.ir

عبور نمی‌کنند و بر سطح آن باقی می‌مانند).

کشت آکانتامبا در محیط آگار غیرمغذی (Non Nutrient Agar) ۱/۵ درصد حاوی باکتری اشرشیاکلی انجام شد.[۱۰] این محیط با استفاده از پودر باکتو آگار (Difco) و بافر Amoeba Page Salin تهیه شد. بافر فوق ترکیبی از مواد زیر بود: ۲/۵ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۱ میلی‌مولار KH2PO4، ۰/۵ میلی‌مولار Na2Hpo4، ۴۰ میکرومولار CaCl2 6H2O و ۲۰ میکرومولار MgSO2 7H2O با PH نهایی حدود ۶/۹ . هر فیلتر به طور مستقیم به پلیت محیط کشت منتقل شد؛ به طوری که سطح رویی آن که حاوی رسوبات بود بر روی محیط کشت قرار گرفت. محیط‌های کشت داده شده در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و از روز چهارم پس از کشت از نظر وجود کیست یا تروفوزوئیت به روش میکروسکوپی مورد مطالعه قرار گرفتند. کشت‌ها حداکثر یک ماه نگه‌داری و در صورت عدم مشاهده آمیب پس از این مدت، منفی در نظر گرفته شدند.

برای استخراج و به دست آوردن مقدار کافی DNA، حدود ۴ تا ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (PBS) استریل به محیط کشت افزوده و سطح پلیت کاملاً با بافر PBS مخلوط شد تا تروفوزوئیت‌ها در بافر غوطه‌ور شوند. بافر حاوی تروفوزوئیت و کیست به داخل میکروتیوب منتقل و به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. هر نمونه سه مرتبه با بافر PBS و به کمک سانتریفیوژ شستشو داده شد تا آگار اضافی از نمونه‌ها حذف شود. برای استخراج DNA آکانتامبا از کیت تجاری DNG^{TM}–PLUS (سیناژن–ایران) استفاده و طبق دستور کار آن عمل شد. غلظت DNA استخراج شده از هر نمونه با استفاده از دستگاه Nanodrop ND-1000 (Ttermo Fisher Scientific, USA) در طول موج ۲۶۰ نانومتر برحسب نانوگرم در میکرولیتر اندازه‌گیری شد.

برای تشخیص آکانتامبا از سایر آمیب‌های آزادزی از تکثیر قطعه‌ای از ژن زیر واحد کوچک RNA ریبوزومی (SS rRNA) استفاده شد. تشخیص طبق روش افتخار و همکاران و با بهره‌گیری از پرایمرهای استفاده شده توسط شرودر و همکاران انجام شد.[۹و۱۱]

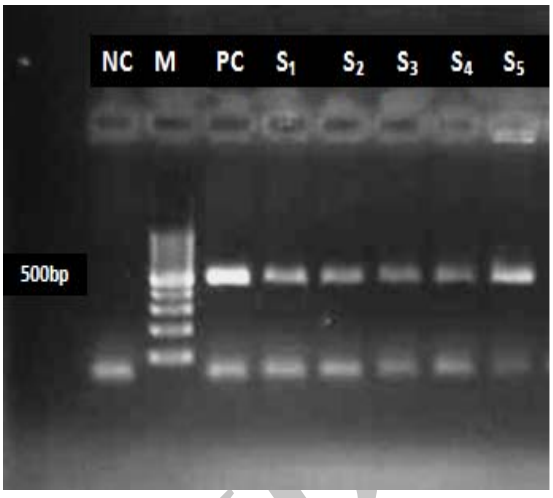
از اولیگونوکلئوتیدهای JDP1 و JDP2 باترادف -5́) (GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA و 5́) (TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA به ترتیب به عنوان پرایمر رفت و پرایمر برگشت استفاده شد. واکنش PCR در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری حاوی ۱/۲۵ واحد Taq DNA polymerase، ۲۰ نانوگرم DNA، ۱/۵میلی‌مولار MgCl2، ۳۰۰ میکرومولارdNTP و ۰/۲ میکرومولار از هریک از پرایمرها با استفاده از دستگاه (Applied Biosystems,USA) Veriti Thermal Cycler انجام شد. PCR در ۳۲ دور انجام شد که عبارت بود از: دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در۹۴ درجه سانتی‌گراد، دناتوراسیون به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال اولیه به مدت ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، طویل‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و طویل‌سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و باندهای به دست آمده با استفاده از دستگاه (Uvitec Cambridge, UK) Gel-documintatio مشاهده و عکس‌برداری شد. PCR نمونه‌ها در کنار نمونه شاهد مثبت و شاهد منفی در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد.

*** یافته‌ها:**

از ۴۰ نمونه مورد بررسی، آمیب آزادزی در ۳۲ نمونه (۸۰ درصد) به روش کشت تشخیص داده شد. با روش PCR، در ۱۴ نمونه از ۳۲ نمونه مثبت آمیب آزادزی (۴۳/۸ درصد) آکانتامبا تشخیص داده شدکه باندی حدود ۵۰۰bp را نشان دادند (شکل شماره ۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- PCR کشت‌های مثبت آمیب‌های آزادزی در محیط آگار غیرمغذی از نظر آکانتامبا

M= مارکر
NC= شاهد منفی
S= نمونه
PC= شاهد مثبت

* بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد که حدود یک سوم نمونه‌های آب های راکد سطحی شهر قزوین به روش PCR از نظر وجود آکانتامبا، مثبت بودند که نشان‌دهنده خطر بالقوه این آب‌ها در بروز آکانتامبیازیس در گروه‌های در معرض تماس به ویژه افراد پر خطر است.

امروزه لنزهای تماسی به عنوان عامل خطر کراتیت آکانتامبایی در نظر گرفته می‌شوند و ضایعه‌های چشمی ناشی از آکانتامبا به طور عمده در استفاده‌کنندگان از این نوع لنزها مشاهده می‌شود. در ایران نیز موارد مربوط به کراتیت آکانتامبایی به خصوص در استفاده‌کنندگان از لنزهای رنگی و آرایشی رو به افزایش است.[۱۲-۱۶]

فراوانی کشت مثبت آمیب آزادزی در مطالعه حاضر ۸۰ درصد بود که حدود ۲۵ درصد بیش از مطالعه مشابهی است که در تهران انجام شده است.[۱۱] البته فراوانی آکانتامبا به روش PCR، در مطالعه حاضر و مطالعه تهران تقریباً یکسان بود (به ترتیب حدود ۴۴ و ۴۶ درصد). این شهرها مرکز دو استان همجوار و از نظر شرایط اقلیمی بسیار مشابه هستند و فاصله تقریباً نزدیکی با هم دارند. تفاوت فراوانی کشت آمیب ممکن است تا حدی مربوط به تفاوت فصل نمونه‌برداری در این دو مطالعه باشد. به طوری که فصل نمونه‌برداری در مطالعه حاضر پاییز بوده، ولی در مطالعه تهران گزارش نشده است. تفاوت فراوانی جداسازی آکانتامبا از محیط با توجه به فصل نمونه‌برداری و همچنین تفاوت فصلی در فراوانی موارد کراتیت آکانتامبایی قبلاً گزارش شده است.[۱۷و۱۸] علت احتمالی دیگر تفاوت فراوانی کشت مثبت آمیب در این دو مطالعه، تعداد نمونه‌هایی است که مورد آزمایش قرار گرفتند. تعداد نمونه‌های مورد آزمایش در مطالعه حاضر حدود دو برابر نمونه‌هایی است که در تهران مطالعه شدند.

علی‌رغم آن که آب‌های سطحی زیستگاه معمول آکانتامبا هستند، ولی این آمیب با فراوانی‌های مختلف از انواع محیط‌های آبی که انسان در معرض تماس با آن‌ها قرار می‌گیرد، گزارش شده است. آلودگی به آکانتامبا در ۱۳/۲درصد از ۶۸ نمونه آب چشمه‌های گرم طبیعی در تایلند، ۷/۷ درصد از ۲۰۷ نمونه آب لوله‌کشی خانگی در کره، ۶۱ درصد از ۵۱ نمونه آب رودخانه در ژاپن گزارش شده است.[۱۹-۲۱]

در مطالعه حاضر از روش PCR برای تأیید تشخیص آکانتامبا در نمونه‌های کشت مثبت استفاده شد؛ زیرا تشخیص افتراقی آکانتامبا از سایر آمیب‌های آزادزی به روش میکروسکوپی مشکل و گاهی غیرممکن است. PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس آکانتامبا تا حد زیادی این مشکل را برطرف می‌کند. البته این روش نیز محدودیتی دارد؛ برای مثال با این روش نمی‌توان ژنوتایپ‌های آکانتامبا را تشخیص داد. ژنوتایپ‌های مختلفی از آکانتامبا شناسایی شده است که برخی از آن‌ها بیماری‌زا و بقیه غیر بیماری‌زا هستند.[۲۲] شناسایی ژنوتایپ‌ها در هر محیط و منطقه جغرافیایی و تعیین ژنوتایپ غالب آن بسیار ارزشمند است.

Archive of SID

www.SID.ir

به طور کلی، آکانتامبا آمیب آزادزی شایعی در آب‌های سطحی راکد شهر قـزوین بـود. لـذا، توجـه پزشـکان بـه بیماری‌های ناشی از این تک یاخته به ویژه در گروه‌هـای در معرض خطر بالا و توجـه دسـت انـدرکاران بهداشـتی منطقه به نقش احتمالی آب‌های راکد سـطحی در انتقـال این عامل عفونی ضـروری بـه نظـر مـی‌رسـد. شناسـایی ژنوتایپ‌های آکانتامبا در این آب‌ها و تعیـین میـزان وفـور گونه‌های بیماری‌زا نیز توصیه می‌شود.

*** سپاس‌گزاری:**

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشـته انگل‌شناسی است کـه بـا همکـاری دانشـگاه‌هـای علـوم پزشکی قزوین و کاشان انجـام شـده اسـت. از همکـاری مسئولان بخش انگل‌شناسی دانشگاه‌های علـوم پزشـکی قـزوین و کاشـان، مرکـز تحقیقـات سـلولی و مولکـولی، آزمایشـگاه مرجـع و دانشـکده بهداشـت دانشـگاه علـوم پزشکی قزوین قدردانی می‌شود.

*** مراجع:**

1. Visvesvara 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 Jun; 50 (1): 1-26

2. Greub G, Raoult D. Biocides currently used for bronchoscope decontamination are poorly effective against free-living amoebae. Infect Control Hosp Epidemiol 2003 Oct; 24 (10): 784-6

3. Borazjani RN, May LL, Noble JA, et al. Flow cytometry for determination of the efficacy of contact lens disinfecting solutions against Acanthamoeba spp. Appl Environ Microbiol 2000 Mar; 66 (3):1057-61

4. Marcino-Cabal F, Jamerson M, Kaneshiro ES. Free-living amoebae, Legionella and Mycobacterium in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. J Water Heal 2010 Mar; 8 (1): 71-82

5. Rezaian M, Hooshyar H. Medical importance of free living Amoebas. J Med Council of Islamic Republic of Iran 2011; 29 (1): 69-83 [In Persian]

6. Torno MS Jr, Babapour R, Gurevitch A, Witt MD. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. J Am Acad Dermatol 2000 Feb; 42 (2 Pt 2): 351-4

7. Rocha-Azevedo B, Menezes GC, Silva-Filho FC. The interaction between Acanthamoeba polyphaga and human osteoblastic cells in vitro. Microb Pathol 2006 Jan; 40 (1):8-14

8. Seal DV. Acanthamoeba keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drug for treatment. Eye 2003 Nov; 17 (8): 893-905

9. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, et al. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sdequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. J Clin Microbiol 2001 May; 39 (5): 1903-11

10. Rezaeian M, Niyyati M, Farnia SH, Motevalli Haghi A. Isolation of Acanthamoeba spp. from different environmental sources. Iran J Parasitol 2008; 3 (1): 44-7

11. Eftekhar M, Nazemalhosseini Mojarad E, Haghighi A, et al. Detection of Acanthamoeba from fresh water using polymerase chain reaction. Pejouhesh 2009; 33 (1): 43-6 [In Persian]

12. Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, et al. Genotyping of Acanthamoeba isolates from clinical and environmental specimens in Iran. Exp Parasitol 2009 Mar; 121 (3): 242-5

Archive of SID

www.SID.ir

13. Radford CF, Bacon AS, Dart JK, et al. Risk factors for acanthamoeba keratitis in contact lens users: a case-control study. BMJ 1995; 310 (6994): 1567-71

14. Lasjerdi Z, Niyyati M, Haghighi A, et al. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. Parasitol Res 2011 Sep; 109 (3): 575-80

15. Lindsay RG, Watters G, Johnson R, et al. Acanthamoeba keratitis and contact lens wear. Clin Expl Optom 2007 Sep; 90 (5): 351-60

16. Maghsood AH, Rezaian M, Rahimi F, et al. Contact lens-associated Acanthamoeba keratitis in Iran. Iran J Public Health 2005; 34 (2): 40-7

17. Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, et al. First report of a mixed infection due to Acanthamoeba genotype T3 and Vahlkampfia in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. Exp Parasitol 2010 Sep; 126 (1): 89-90

18. McAllum P, Bahar I, Kaiserman I, et al. Temporal and seasonal trends in Acanthamoeba keratitis. Cornea 2009 Jan; 28 (1): 7-10

19. Lekkla A, Sutthikornchai C, Bovornkitti S, et al. Free-living ameba contamination in natural hot springs in Thailand. South Asian J Trop Med Public Health 2005; 36 Suppl 4: 5-9

20. Jeong HJ, Yu HS. The role of domestic tap water in Acanthamoeba contamination in contact lens storage cases in Korea. Korean J Parasitol 2005 Jun; 43 (2): 47-50

21. Kawaguchi K, Matsuo J, Osaki T, et al. Prevalence of Helicobacter and Acanthamoeba in natural environment. Lett Appl Microbiol 2009 Apr; 48 (4): 465-71

22. Liang SY, Ji DR, Hsia KT, et al. Isolation and identification of Acanthamoeba species related to amoebic encephalitis and nonpathogenic free-living amoeba species from the rice field. J Appl Microbiol 2010 Oct; 109 (4): 1422-9

Archive of SID

www.SID.ir