Archive of SID

پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۳، شماره ۱، بهار ۱۳۸۸، صفحات ۴۳ تا ۴۶

مقاله اصلی
(Original Article)

شیوع آکانتامبا در آب‌های سطحی شهر تهران

محمد افتخار [۱]، احسان ناظم الحسینی مجرد [۲]، علی حقیقی [۱]، خجسته شریفی [۳]،

زهرا نوچی [۲]، عمید اطهری [*۱]

[۱] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۳] عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان

چکیده

سابقه و هدف: *آکانتامبا شایع‌ترین تک‌یاخته موجود در محیط می‌باشد که در آب و خاک به سر می‌برند. مشخص شده است که آکانتامبا بعد از تروما و تماس با آب آلوده یا استفاده از لنزهای تماسی می‌تواند بطورمستقیم موجب آلوده شدن قرنیه شود. هدف از این مطالعه تشخیص آکانتامبا از آب‌های سطحی میادین سطح شهر تهران با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی، ۲۲ نمونه از آب‌های سطحی جمع‌آوری شد. پس از فیلتر کردن نمونه‌ها، آنها را به محیط کشت NNA منتقل و نمونه‌های کشت مثبت آکانتامبا، با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) مورد ارزیابی قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *۱۳ نمونه (۵۹ درصد) از لحاظ شکل ظاهری کیست‌های به دست آمده، آمیب آزادزی آکانتامبا تشخیص داده شدند که با استفاده از پرایمر اختصاصی جنس آکانتامبا که یک قطعه ۹۰۳ جفت بازی از ژن 18S rRNA را تکثیر می‌کرد. ۶ نمونه از ۱۳ نمونه‌ای که در کشت مثبت بودند، آکانتامبا تشخیص داده شدند، بعبارتی شیوع آکانتامبا ۲۷/۳ درصد به دست آمد.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد آلودگی آب‌های تهران به آکانتامبا شیوع بالایی دارد، لذا اقداماتی جهت بررسی آلودگی آب‌ها و تشخیص صحیح این انگل و یافتن راه‌های پیشگیری از آلوده شدن به آکانتامبا و عوارض ناشی از آن توصیه می‌شود.*

واژگان کلیدی: *آکانتا مبا، آب‌های سطحی، PCR.*

مقدمه

آکانتامبا از خانواده آمیب‌های آزادزی (۱) و یکی از شایع‌ترین تک‌یاخته‌های موجود در طبیعت است. این انگل فرصت طلب از خاک، گرد و غبار، آب تازه، آب دریا، استخرهای شنا، یونیت دندان پزشکی، دستگاه‌های تهویه هوا و فضاهای بیمارستانی جدا شده است (۲). در چرخه زندگی آکانتامبا دو شکل تروفوزوئیت و کیست وجود دارد، کیست‌ها به مواد کشنده مانند کلر و آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان داده وطیف دمایی گسترده‌ای را تحمل می‌کنند (۳،۴). گونه‌های مختلف آکانتامبا بر اساس شکل و اندازه کیست در سه گروه (I، II، III) طبقه‌بندی می‌شوند (۵). با توجه به تغییرات احتمالی مرفولوژی و اندازه کیست به خصوص در محیط‌های کشت، استفاده از معیارهای فوق در طبقه بندی گونه‌ها چندان کمک‌کننده نخواهد بود (۶). در میان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این انگل می‌توان از آنسفالیت گرانولوماتوز آمیبی (Granulomatous Amebic Encephalitis,GAE)، گرانولوماتوز پوستی آکانتامبایی و کراتیت آمیبی مزمن (Cronic Amebic Kratitis,CAK) که یک سندرم وابسته به آب است نام برد

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دکتر عمید اطهری (e-mail: athari@sbmu.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۶/۲۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۱/۲۶

www.SID.ir

Archive of SID

(۳،۷،۸). اکنون مشخص شده است که آکانتامبا می‌تواند مستقیما موجب آلوده شدن قرنیه (معمولا بعد از تروما و تماس با آب آلوده یا استفاده از لنزهای تماسی) شود (۹). با وجود اهمیت و شیوع این بیماری در ایران (۱۰) مطالعات اندکی در زمینه جداسازی آمیب‌های آزادزی از آب صورت گرفته است که در اکثر موارد روش‌های تشخیصی غیر حساس (کشت و میکروسکوپی) به کارگرفته شده است (۱۲،۱۱) . از این رو استفاده از روش‌های مولکولی در تشخیص عوامل عفونی جدا شده از محیط توصیه می‌شود. در این مطالعه روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جهت شناسایی و تشخیص آکانتامبا از آب‌های سطحی و راکد مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روشها

این تحقیق به روش توصیفی انجام گرفت. تعداد ۲۲ نمونه از آب‌های سطحی و راکد شهر تهران از قبیل آب استخر پارک‌ها و میادین عمومی، به میزان ۵۰۰-۱۰۰ میلی‌لیتر جمع آوری شد. نمونه‌ها به کمک دستگاه پمپ خلا و با فیلتر ۰/۴۵ نانومتر صاف شدند و فیلتر آغشته به انگل کشت داده شد.

جهت کشت Monoxenic، فیلتر مرحله قبل روی آگار غیرمغذی (Non Nutrient Agar, NNA) حاوی Page's saline (pH:7.2-7.4) و آغشته به اشرشیاکلی کشته شده با حرارت (به عنوان منبع تغذیه انگل) کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ تا ۲ هفته انکوبه شدند (۱۳).

حدود ۱۰۰۰ آمیب (شمارش شده با لام نئو بار) از محیط کشت Monoxenic برداشته شده و با PBS شسته شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت DNA ^{TM} – Plus (سیناژن) و طبق مراحل ذکر شده در بروشور کیت صورت گرفت. DNA استخراج شده به نسبت ۱:۵۰ با آب مقطر رقیق شد و مقدار جذب آن در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به وسیله UV visible spectrophotometer بدست آمد. سپس جهت تائید شناسائی آمیب‌های جدا شده درکشت به عنوان جنس آکانتامبا، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) که روشی اختصاصی است مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور ناحیه‌ای از ژنوم آکانتامبا که زیر واحد کوچک RNA ریبوزومی (SSU rRNA) را کد می‌کند با پرایمرهای اختصاصی (جدول شماره ۱) (۱۴) تکثیر گردید. این پرایمرها یک قطعه ۹۰۳ جفت بازی (903bp) را تکثیر می‌کنند.

جدول ۱- ترادف زوج پرایمر مورد استفاده در تکثیر ژنوم آکانتامبا

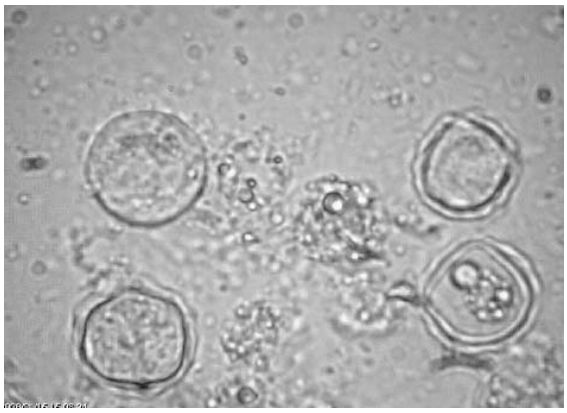
نام پرایمر	ترادف از' ۵ به '۳	طول پرایمر (جفت باز)
Acant F	GCT CCA ATA GCG TAT ATT AA	۲۰
Acant R	AGA AAG AGC TAT CAA TCT GT	۲۰

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتری با ترموسایکلر (Toughch gene) با برنامه زیر در ۳۵ سیکل صورت گرفت: دناتوراسیون اولیه ۳ دقیقه در $^{\circ}$۹۴ درجه سانتی‌گراد، دناتوراسیون ۳۰ ثانیه در $^{\circ}$۹۴ درجه سانتی‌گراد، آنیلینگ ۳۰ ثانیه در ۴۸ درجه سانتی‌گراد، طویل شدن ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و طویل شدن نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

شیوع آلودگی آکانتامبا در کل نمونه‌ها و نیز در کشت‌های مثبت تعیین گردید.

یافته‌ها

از مجموع ۲۲ نمونه جمع‌آوری شده از آب‌های سطحی راکد در سطح شهر تهران، ۱۳ نمونه (۵۹/۱ درصد) در کشت Monoxenic از لحاظ شکل ظاهری کیست‌های به دست آمده، آمیب آزادزی آکانتامبا تشخیص داده شدند (شکل۱).



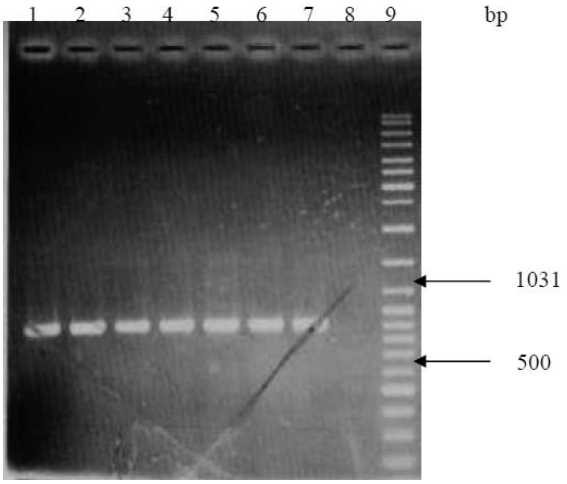
شکل۱- کیست آکانتامبا جدا شده از آب راکد (بزرگنمایی 400X)

نمونه‌های کشت مثبت آکانتامبا، با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از پرایمر اختصاصی جنس آکانتامبا که یک قطعه ۹۰۳ جفت بازی از ژن 18S rRNA را تکثیر می‌کرد، باندهای مورد نظر به دست آمد. در این روش، ۶ نمونه از ۱۳ نمونه‌ای که در کشت مثبت بودند، آکانتامبا تشخیص داده شدند (شکل ۲). شیوع

www.SID.ir

Archive of SID

آکانتامبا بربر ۲۷/۳ درصد بود و ۴۶/۱ درصد موارد کشت مثبت، نتیجه PCR مثبت داشتند.



شکل ۲- کیست آکانتامبا جدا شده از آب راکد (بزرگنمایی 400X). ستون۶-۱: شش ایزوله آکانتامبا، ستون ۷: کنترل مثبت آکانتامبا، ستون ۸: کنترل منفی، ستون ۹: مارکر (DNA Ladder Mix).

بحث

این تحقیق نشان داد که شیوع آلودگی آکانتامبا در آب]های سطحی شهر تهران ۲۷/۳ درصد است. انتشار آکانتامبا در مناطق مختلف و شرایط گوناگون آب و هوایی از استوا تا قطب گزارش شده است (۶،۳،۲). در مطالعه‌ای که در جامائیکا صورت گرفت، آلودگی آب لوله‌کشی، آب رودخانه و آب دریا به انگل آکانتامبا به ترتیب ۳۶/۱ درصد، ۲۶/۴ درصد و ۴۹/۶ درصد گزارش شد (۱۵).

در مطالعه دیگری میزان آلودگی به آکانتامبا در آب‌های خانگی شهر سئول کره ۷/۷ درصد گزارش شد (۱۶). در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۷۶ در منطقه کازرون انجام شد، از مجموع ۳۵۴ نمونه آب و خاک که از دریاچه و رودخانه‌های منطقه جمع‌آوری شده بود، ۱۰ مورد آمیب آکانتامبا و ۳ مورد نگلریا جدا شد (۱۱) . در مطالعه صورت گرفته در سال ۱۳۸۷ از مجموع ۸۰ نمونه جمع‌آوری شده از آب، خاک و یونیت دندان‌پزشکی، ۴۶/۲۵ درصد نمونه‌ها به آکانتامبا آلودگی داشتند (۱۲). هرچند در این مطالعه از روش حساس PCR برای شناسایی آکانتامبا استفاده شده است، اما در دسترس نبودن کشت آگزنیک برای جدا سازی انگل و استخراج DNA از آن، از محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد. چرا که جداسازی انگل از پلیت‌های کشت با مشکلاتی مواجه است. انتظار می‌رود در صورت در اختیار داشتن کشت خالص انگل، استخراج DNA و در پی آن واکنش PCR با موفقیت بیشتری همراه باشد. با توجه به وجود زمینه‌های مستعد کننده عفونت آکانتامبائی در جامعه، شناسایی کانون‌های آلودگی جهت جلوگیری از عفونت‌های احتمالی الزامی می‌نماید.

هرچند مواردی از عفونت‌های آکانتامبائی در کودکان با سیستم ایمنی کار آمد گزارش شده است، ولی این آمیب به عنوان یک انگل فرصت طلب، بیشتر در افراد با سیستم ایمنی ناکارآمد هم‌چون گیرندگان عضو، مبتلایان به ایدز و افراد مبتلا به بیماری‌های سیستمیک ناتوان کننده مانند هپاتیت، دیابت و بدخیمی بیماری ایجاد می‌کند (۷،۶). بدیهی است با افزایش موارد این بیماری‌ها احتمال فزونی عفونت‌های آکانتامبائی افزایش یابد. از آنجایی که آب به عنوان یکی از منابع انتقال انگل عمل می‌کند، بررسی آلودگی آب‌های لوله‌کشی، سطحی و راکد که در دسترس قرار دارند، دارای اهمیت فراوانی می‌باشد.

قدردانی و تشکر

نگارندگان این مقاله از زحمات همکاران گرامی در گروه انگل‌شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که در انجام این طرح به آنها یاری رساندند، صمیمانه قدردانی می کنند. هم‌چنین از زحمات کارکنان محترم دایره تحقیقات بیماری‌های ناشی از غذا در مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش وکبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به ویژه آقای اسماعیل گلدوست، صمیمانه تشکر می‌کنند.

REFERENCES

1. Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathol 1997;7: 583-98.
2. Mergeryan, H. The prevalence of Acanthamoeba in the human environment. Rev Infect Dis 1991;13:S390-91.
3. Khan NA. Pathogenesis of Acanthamoeba infections. Microb Pathog 2003;34:277-85.
4. Armstrong M. The pathogenesis of human Acanthamoeba infection. Infect Dis Rev 2000;2:65-73.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre Acanthamoeba. Protistologica 1977;13:557-98.

6. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol 2004;34:1001-27.

7. Marciano-Cabral F, Cabral G. Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev 2003;16: 273-307.

8. 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;12:233-36.

9. Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of Acanthamoeba keratitis. Trends Parasitol 2006;22:175-80.

10. Rezaeian M, Farnia Sh, Niyyati M, Rahimi F. Amoebic keratitis in Iran (1997- 2007). Iranian J Parasitol 2007;2:1-6.

11. Rezaian M, Bagheri F, Farnia Sh, Babai Z. Isolation of pathogenic amoeba (naegleria and acanthameoba) from water sources and margin soils of reveirs and lakes in kazerun. Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research 2003;1:41-48.

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

13. Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 5th ed. Washington, D.C.: ASM Press. 2007. p.1202.

14. Kong HH, Chung DI. PCR and RFLP variation of conserved region of small subunit ribosomal DNA among Acanthamoeba isolates assigned to either A. castellanii or A. polyphaga. Korean J Parasitol 1996;34:127-34.

15. Lorenzo-Morales J, Lindo JF, Martinez E, Calder D, Figueruelo E, Valladares B, et al. Pathogenic Acanthamoeba strains from water sources in Jamaica, West Indies. Ann Trop Med Parasitol 2005;99:751-58.

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

www.SID.ir