Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۲۰، شماره ۵/ آذر و دی ۱۳۹۷/ ۱۱۵-۱۰۱

مقاله پژوهشی

جداسازی، تشخیص و تعیین ژنوتیپ های آکانتامبا در آب های سطحی استان چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۹۵

سمیه خدابخشی[۱]، کورش منوچهری نائینی[۱*]، رحمان عبدی زاده[۱]، سلیمان خیری[۲]، شهربانو پرچمی[۳]

گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۲]گروه اپیدمیولوژی و آمارزیستی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۳]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۸

چکیده:

زمینه و هدف: **اعضای جنس آکانتامبا آمیب های آزادزی هستند که در محیط های طبیعی از قبیل آب های سطحی و خاک از پراکندگی گسترده‌ای برخوردارند. برخی از گونه های آکانتامبا قادرند در انسان طیفی از بیماری ها نظیر آنسفالیت آمیبی مزمن، کراتیت و ضایعات پوستی را ایجاد کنند. آگاهی از انتشار گونه های آکانتامبا در منابع محیطی، به ویژه در آب های سطحی می تواند اطلاعات ارزشمندی را در اختیار پزشکان و کارشناسان بهداشت قرار دهد. هدف از این مطالعه جداسازی، تشخیص و تعیین ژنوتیپ های آکانتامبا در آب های سطحی بود.**

روش بررسی: **در این مطالعه توصیفی- تحلیلی ۱۰۴ نمونه از آب های سطحی استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از روش های کشت، مشاهده میکروسکوپی و روش های مولکولی واکنش زنجیره ای پلی مراز و تعیین توالی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به دست آمده از انجام آزمایش ها با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS و آزمون های آماری دقیق فیشر، مک نمار و مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.**

یافته ها: **در این مطالعه کلیه نمونه های کشت شده روی محیط آگار غیر مغذی پس از طی دوره انکوباسیون و در زمان های متفاوتی روی محیط رشد یافته بودند. با این حال، آزمایش میکروسکوپی و واکنش زنجیره ای پلی مراز نشان داد که با استفاده از دو روش اخیر به ترتیب، ۶۳/۴۶٪ و ۲۲/۱٪ از نمونه ها از نظر وجود آکانتامبا مثبت بوده اند. در مطالعه حاضر آزمون دقیق فیشر نشان داد که میزان فراوانی آکانتامبا در شهرستان ها به طور معنی داری با یکدیگر متفاوت بود (P=۰/۰۳۴). بر اساس تجزیه و تحلیل یافته های این مطالعه، آزمون مربع کای نشان داد که بین میزان فراوانی آکانتامبا در مناطق شهری و روستایی تفاوت معنی دار جزئی وجود دارد (P=۰/۰۵۹). در این مطالعه تعیین توالی DNA آکانتامبا نشان داد که در آب های این استان تنها سه ژنوتیپ T2، T4 و T5 وجود دارند که در بین آن ها ژنوتیپ T4 آکانتامبا از فراوانی بیشتری برخوردار است.**

نتیجه گیری: **مطالعه حاضر نشان داد که در آب های سطحی استان گونه ها و ژنوتیپ های مختلفی از آکانتامبا وجود دارند که با توجه به پتانسیل بیماری زایی برخی از آن ها برای انسان، به ویژه در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی، پزشکان باید از این خطر بالقوه محیطی آگاه شوند.**

واژه های کلیدی: **آکانتامبا، چهارمحال و بختیاری، آب های سطحی، کشت، ژنوتیپ.**

مقدمه:

اعضای جنس نگلریا، آکانتامبا، بالاموثیا و ساپینیا گروهی از آمیب های آزادزی هستند که در محیط های طبیعی، به ویژه در محیط های آبی به وفور یافت می شوند. برخی از این آمیب ها قادرند در شرایط خاصی پس از ورود به بدن انسان موجب عفونت های خطیر سیستم اعصاب مرکزی، چشم و پوست شوند. آمیب های

نویسنده مسئول: *شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- گروه انگل شناسی- تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۳۵۶۳۵، E-mail: k_manouchahri@yahoo.com*

www.SID.ir

Archive of SID

مذکور همچنین می توانند برای ارگانیسم هایی همانند لژیونلا، کمپیلوباکترژوژونی، لیستریا مونوسیتوژنز، ویبریوکلرا، مایکوباکتریوم لپره، بورخولدریا سپاسیا، بورخولدریا پیکتی و سودوموناس آئروژینوزا میزبان های مناسبی باشند (۳-۱). مضافاً، وجود این آمیب‌ها در منابع آب خانگی ممکن است موجب افزایش بیماری زایی آن ها برای انسان گردد (۴). از سویی، عفونت ناشی از نگلریا، آکانتامبا، بالاموثیا و ساپینیا از نظر بالینی چندان شناخته شده نیست. علاوه بر این، روش های موجود برای تشخیص آزمایشگاهی این آمیب ها نیز برای بسیاری از آزمایشگاه ها ناشناخته بوده و یا در بسیاری از آزمایشگاه ها انجام نمی پذیرد. در گذشته، آمیب های جنس آکانتامبا به عنوان هارتمنلا شناخته می شدند؛ اما در سال ۱۹۷۵، Sawyer و Griffin این آمیب‌های پوشیده از پاهای کاذب خار مانند را در خانواده جدیدی بنام آکانتامبیده طبقه بندی نمودند. برجسته ترین مشخصه تروفوزوئیت آکانتامبا وجود پاهای کاذب خارمانند یا آکانتاپود در آن ها است (۵). گونه های جنس آکانتامبا در مسیر تکاملی خود دارای دو مرحله تروفوزوئیتی و کیستی می باشند. در سال ۱۹۸۷، De Jonckheere بر اساس ریخت شناسی و مطالعات ایزو آنزیمی ۱۷ گونه مختلف از آکانتامبا را شناسایی نمود که ۷ گونه از آن ها با عفونت های انسانی در ارتباط بودند. امروزه، بر اساس تعیین توالی ژن RNA ریبوزومی، آکانتامبا به ۱۷ ژنوتیپ مختلف T1-T17 تقسیم بندی شده است. هر ژنوتیپ با ژنوتیپ های دیگر حدود ۵٪ یا بیشتر تفاوت دارد. بررسی گزارشات مختلف از موارد عفونت های انسانی نشان می دهد که بیشتر عفونت های در انسان در اثر ابتلاء به ژنوتیپ T4 آکانتامبا رخ داده است. به عنوان مثال ۹۰٪ از کراتیت های آکانتامبایی شناسایی شده به ژنوتیپ T4 آکانتامبا نسبت داده شده است. همچنین، این ژنوتیپ به عنوان یکی از ژنوتیپ های اصلی ایجاد کننده آنسفالیت گرانولوماتوز آمیبی و آکانتامبیازیس پوستی قلمداد شده است (۶).

گونه های مختلف آکانتامبا می توانند در محیط های مختلفی از قبیل آب، خاک، فاضلاب های شهری و آب استخرها وجود داشته باشند. کیست های این آمیب قادرند در آب در دمای ۴+ درجه سانتی گراد تا ۲۴ سال زنده باقی بمانند. برخی مطالعات نشان داده اند که کیست های آکانتامبا می توانند تا ۲۵ سال در محیط زنده مانده و ویژگی های تهاجمی خود را حفظ کنند (۸-۶).

به طور معمول شناسایی گونه های مختلف آکانتامبا در محیط های طبیعی از قبیل آب یا خاک به طور معمول از طریق بررسی میکروسکوپی و کشت نمونه های جمع آوری شده از محیط و بر اساس خصوصیات ساختاری کیست های ارگانیسم صورت می گیرد؛ اما تشخیص دقیق گونه ها و سویه های این آمیب و تعیین هویت آن ها با استفاده از روش های فوق امکان پذیر نیست. در سال های اخیر استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلی مراز تا حد زیادی این مشکل را برطرف نموده است. به گونه ای که روش اخیر روش مناسبی برای افتراق آکانتامبا از سایر آمیب های آزادزی موجود در محیط به شمار می رود (۱۱-۹). با توجه به اینکه تاکنون در استان چهارمحال و بختیاری هیچ گونه اطلاعات مستندی در خصوص آکانتامبا، میزان پراکندگی جغرافیایی و ژنوتیپ های مختلف آن در دسترس نمی باشد، مطالعه حاضر با هدف جداسازی، تشخیص و تعیین ژنوتیپ های آکانتامبا درآب های سطحی این منطقه از کشور انجام گرفته است.

روش بررسی:

ناحیه مورد مطالعه این تحقیق، استان چهارمحال و بختیاری با وسعت ۱۶۵۳۲ کیلومتر مربع و در ´ ۰۹ °۳۱ عرض شمالی و ´ ۴۸ °۳۲ طول شرقی در مرکز کوه های زاگرس، بین کوه های داخلی و کوه های اصفهان واقع شده است و از شمال و شرق به استان اصفهان، از غرب به استان خوزستان، از جنوب به استان کهگیلویه و بویراحمد

www.SID.ir

Archive of SID

و از شمال غرب به استان لرستان محدود شده است. بر اساس آخرین تقسیمات کشوری، استان چهارمحال و بختیاری به ۹ شهرستان تقسیم شده است (۱۲). اگرچه این استان حدود ۱٪ از وسعت کشور را به خود اختصاص داده است، با این حال، حدود ۱۰٪ منابع آبی کشور در این منطقه قرار دارد. استان چهارمحال و بختیاری در نواحی مختلف خود از آب و هوا و اقلیم های متفاوتی برخوردار است. بارندگی در این استان از بادهای مدیترانه ای که از غرب و جنوب غرب می وزند، تأثیر می پذیرد. از نظر میزان بارندگی، ارتفاعات غرب استان با ۱۶۰۰ میلی متر باران در سال پرباران ترین و ارتفاعات سبز کوه با ۱۴۰۰ میلی متر و ارتفاعات جنوب غربی با ۹۰۰ میلی متر بارندگی در سال به ترتیب دومین و سومین نواحی پرباران و مناطق شرق و شمال شرقی با ۳۰۰-۲۵۰ میلی متر باران در سال، کم بارش ترین مناطق استان را به خود اختصاص می دهند. با توجه به ماهیت کوهستانی بودن استان، دما در مناطق مختلف بسیار متفاوت است. به طوری که حداکثر دمای ثبت شده با ٤٧/٥°C متعلق به لردگان و حداقل دمای ثبت شده با ٣٤/٥°C- متعلق به دزک واقع در شهرستان شهرکرد بوده است (۱۴،۱۳).

این مطالعه توصیفی- تحلیلی در خلال ماه های اردیبهشت تا آبان سال ۱۳۹۵ روی آب های سطحی استان چهارمحال و بختیاری انجام پذیرفت. در تحقیق حاضر نمونه های مورد مطالعه به صورت غیر احتمالی آسان و عمدتاً از مناطق گردشگری استان انتخاب گردیدند. برای تعیین حجم نمونه بر اساس نتایج برخی مطالعات انجام شده در ایران با فرض این که میزان فراوانی آکانتامبا در منابع آبی ۵۰٪ باشد، با در نظر گرفتن ضریب اطمینان ۹۵٪ و دقت ۱۰٪، حجم نمونه مورد نیاز ۹۶ مورد تعیین گردید (۱۵). به منظور لحاظ دقت بیشتر تعداد ۱۰۴ مورد بررسی شد.

برای انجام کشت ابتدا نمونه های جمع آوری شده در بطری های استریل ۱۵۰۰ میلی لیتری پلاستیکی با استفاده از دستگاه پمپ خلاء میلی پور و فیلترهای نیترو سلولزی با منافذ ۰/۴۵ میکرون به مدت ۲-۱ دقیقه فیلتر گردیده و پس از خارج نمودن فیلتر از دستگاه در شرایط استریل فیلتر به صورت وارونه روی پلیت حاوی محیط کشت آگار غیر مغذی پوشیده شده با باکتری اشریشیاکلی قرار داده شد و سپس به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۲۷-۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در ادامه پس از گذشت زمان انکوباسیون، محیط‌های کشت از نظر رشد کلنی های آمیب با استفاده از میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت و برای اطمینان مقدار اندکی از کلنی رشد یافته در محیط کشت در شرایط استریل از محیط برداشته و پس از تهیه گسترش و رنگ آمیزی با گیمسا نمونه از نظر وجود کیست یا تروفوزوئیت آمیب های آزادزی مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت (۱۶). در مواردی که پس از زمان انکوباسیون اولیه نتایج کشت منفی بود برای حصول اطمینان، پلیت ها حداکثر به مدت یک ماه در شرایط انکوباسیون فوق نگهداری گردید و پس از این مدت در صورت عدم مشاهده آمیب پس از این مدت نتیجه کشت منفی در نظر گرفته شد. برای انجام بررسی های مولکولی و به دست آوردن مقدار کافی DNA ٤ تا ٥ میلی لیتر فسفات بافر نمکی (PBS) استریل (pH=۷/۲) به محیط کشت افزوده و سطح پلیت کاملاً با بافر مخلوط شد تا ارگانیسم ها در بافر غوطه ور شوند. سپس بافر حاوی ارگانیسم به داخل میکروتیوب استریل منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. هر نمونه سه مرتبه با بافر شستشو داده شد تا آگار اضافی از نمونه ها خارج شود (۱۰). در این مطالعه برای استخراج DNA از کیت تجاری DNGTM–PLUS (سیناژن، ایران) و جهت ارزیابی کمی DNA از دستگاه نانودراپ (Thermo scientific ساخت کشور لیتوانی) با طول موج ۲۶۰ نانومتر و برای انجام آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) و تشخیص و متمایز نمودن آکانتامبا از سایر آمیب های آزادزی موجود در نمونه ها از ژن اختصاصی زیر واحد کوچک RNA ریبوزومی و پرایمرهای JDP1 و JDP2 به ترتیب با ترادف

www.SID.ir

Archive of SID

5′GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA3′ و 3′TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA5′ به عنوان پرایمرهای رفت و برگشت و شرایطی که در جدول شماره ۱ به آن اشاره شده است استفاده شد (۱۵).

جدول شماره ۱: شرایط انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز جهت تشخیص آکانتامبا در نمونه آب های سطحی استان چهارمحال و بختیاری

مراحل	مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان	تعداد سیکل
مرحله اول	تغییرماهیت مقدماتی	۹٤	٤′	۱
مرحله دوم	تغییر ماهیت	۹٤	٤٥″	
	گداختگی	٥٦/٥	٤٠″	۳۰
	بسط	۷۲	۱′	
مرحله سوم	بسط نهایی	۷۲	٥′	۱

پس از انجام واکنش زنجیره پلی مراز، محصول واکنش با رنگ پاورلد (Power load) مخلوط و روی ژل اگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد و باندهای حاصله با استفاده از دستگاه مستندساز ژل مشاهده گردید. سپس برای تعیین توالی DNA آکانتامبا و تشخیص ژنوتیپ های آن محصول واکنش زنجیره ای پلی مراز به کشور کره جنوبی ارسال شد. در مرحله بعد، توالی نوکلئوتیدی تمامی نمونه های مثبت با استفاده از برنامه کروماس اصلاح و در برنامه BLAST توالی مورد نظر در قسمت Nucleotide Blast سایت NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) با توالی های ثبت شده مورد مقایسه و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

پس از جمع آوری نتایج و تکمیل چک لیست ها، داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS پردازش گردیده و نتایج بر اساس آمار توصیفی (فراوانی و درصد) و آزمون‌های آماری دقیق فیشر، مجذور کای و مک نمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

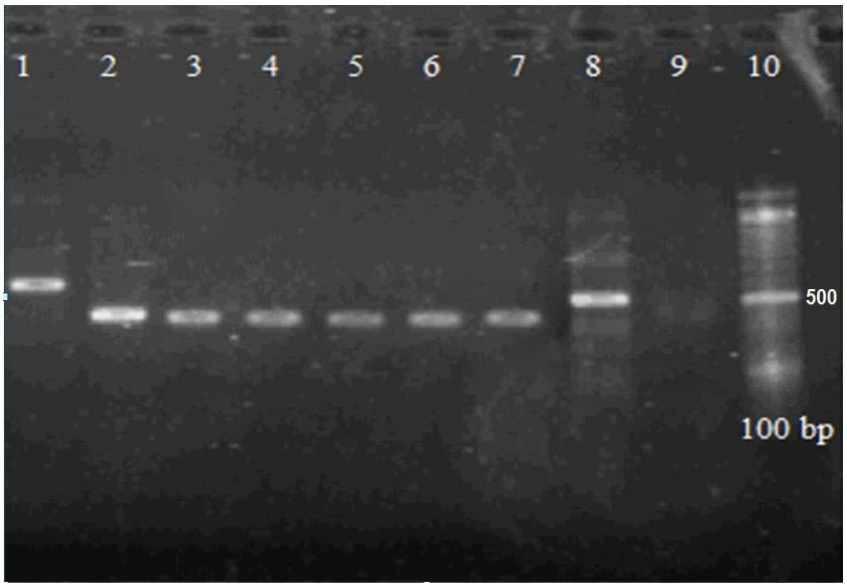
مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.SKUMS.1395.199 در دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تصویب و اجرا گردید.

یافته‌ها:

در این مطالعه که به منظور جداسازی، تشخیص و تعیین هویت آکانتامبا در آب های سطحی استان چهارمحال و بختیاری انجام گرفت، ۱۰۴ نمونه از آب های سطحی جمع آوری شده از مناطق مختلف استان با استفاده از روش های انگل شناسی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. رشد کلنی های آمیبی روی کلیه پلیت های کشت نشان داد که در تمامی نمونه ها نوعی از آمیب های آزادزی وجود دارند. با این وجود، نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی نشان داد که از ۱۰۴ نمونه رشد یافته در محیط های کشت فقط در ۶۶ نمونه (۶۳/۴۶٪) کیست ها یا تروفوزوئیت های شبیه به آکانتامبا وجود دارند. با این وجود، نتایج آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز نشان داد که از ۱۰۴ نمونه مورد مطالعه، تنها در ۲۳ نمونه (۲۲/۱٪) باندهایی به طول ۴۳۰ تا ۵۵۰ جفت که موید وجود گونه‌های مختلف آکانتامبا است وجود دارد (تصویر شماره ۱). در این زمینه آزمون مک نمار نشان داد که میزان فراوانی آکانتامبا بر حسب روش مورد استفاده به طور معنی داری متفاوت است (P=۰/۰۰۱) (جدول شماره ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۱: نمایی از باندهای به دست آمده از الکتروفورز محصول DNA (طول این باندها از ٤٣٠ تا ٥٥٠ جفت باز متغیر است) (تصویر با اصالت)

۱،۲،۳،٤،٥،٦،۷= نمونه آکانتامبا؛ ۸= کنترل مثبت؛ ۹= کنترل منفی؛ ۱۰= مارکر وزنی.

جدول شماره ۲: میزان فراوانی آکانتامبا در آب های سطحی استان چهارمحال و بختیاری بر حسب روش مورد استفاده

نتیجه آزمایش	مثبت		منفی		P
روش	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	
میکروسکوپی	٦٦	٦٣/٥	٣٨	٣٦/٥	<۰/۰۰۱*
مولکولی	٢٣	٢٢/١	٨١	٧٧/٩	

*: آزمون مک نمار.

این مطالعه همچنین نشان داد که میزان فراوانی آکانتامبا در آب های سطحی شهرستان های مختلف استان به طور معنی داری با یکدیگر متفاوت است. به طوری که بیشترین درصد فراوانی این آمیب در شهرستان کیار (۶۶/۷٪) و کمترین آن در شهرستان اردل (۰٪) مشاهده گردید (جدول شماره ۳) (تصویر شماره ۲). در این زمینه آزمون دقیق فیشر نشان داد که بین شهرستان محل نمونه گیری و میزان فراوانی آکانتامبا در آب های سطحی منطقه همبستگی آماری معنی داری وجود دارد (P=۰/۰۳۴). در مطالعه حاضر میزان فراوانی آکانتامبا در آب های سطحی شهری و روستایی به ترتیب ۲۸/۸٪ و ۱۳/۳٪ تعیین گردید. در این مطالعه آزمون آماری مجذور کای نشان داد که بین میزان فراوانی آکانتامبا در آب های سطحی شهری و روستایی ارتباط آماری جزیی وجود دارد (P=۰/۰۵۹).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۳: توزیع فراوانی آکانتامبا در آب های سطحی استان چهارمحال و بختیاری بر حسب شهرستان محل نمونه گیری با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز

شهرستان	مثبت		منفی		P
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	
شهرکرد	۸	۲۵	۲٤	۷۵	
کیار	۲	٦٦/۷	۱	۳۳/۳	
فارسان	۲	۱۸/۲	۹	۸۱/۸	
کوهرنگ	۳	۵۰	۳	۵۰	
بروجن	٤	۳٦/٤	۷	٦۳/٦	۰/۰۳٤*
سامان	۱	۲۵	۳	۷۵	
لردگان	۲	۱۵/٤	۱۱	۸٤/٦	
بن	۱	۲۰	٤	۸۰	
اردل	۰	۰	۱۹	۱۰۰	
جمع	۲۳	۲۲/۱	۸۱	۷۷/۹	

*: آزمون دقیق فیشر.

یافته های این مطالعه نشان داد که میزان فراوانی آکانتامبا در آب های جاری و راکد استان به ترتیب، ۲۳/۳٪ و ۱۹/۴٪ بوده است. در این زمینه آزمون آماری مجذور کای نشان داد که بین میزان فراوانی آکانتامبا و نوع جریان آب ارتباط آماری معنی داری وجود ندارد (P=۰/۶۵۸).

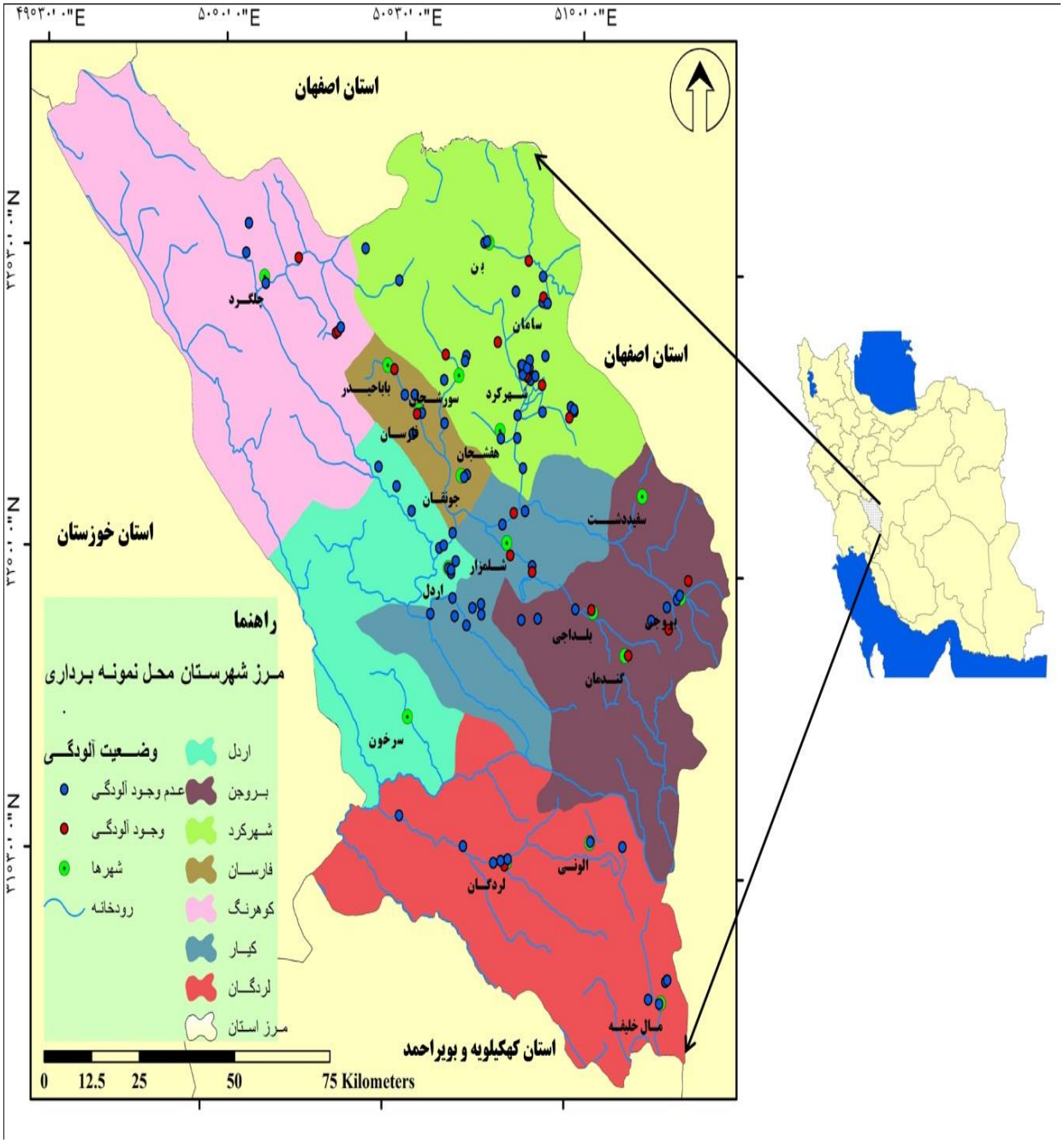
هرچند در این مطالعه میزان فراوانی آکانتامبا در منابع آبی مختلف با یکدیگر متفاوت بود، اما با این وجود، آزمون دقیق فیشر هیچ گونه رابطه معنی داری بین میزان فراوانی آکانتامبا و منابع آبی مورد مطالعه را نشان نداد (P=۰/۲۱۶) (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۴: توزیع فراوانی آکانتامبا بر حسب منابع مختلف آب های سطحی استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز

منبع نمونه برداری	مثبت		منفی		P
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	
چشمه	۱۳	۲۵	۳۹	۷۵	
قنات وآب راهه کشاورزی	۲	۳۳/۳	٤	٦٦/۷	
استخر شنا	۰	۰	۱۱	۱۰۰	
رودخانه	۰	۰	٦	۱۰۰	
میادین عمومی	٤	٤٤/٤	۵	۵۵/٦	۰/۲۱٦
استخر پارک و آب نما	۲	۲۰	۸	۸۰	
آبگیر و تالاب	۱	۳۳/۳	۲	٦٦/۷	
چاه	۱	۱٤/۳	٦	۸۵/۷	
جمع	۲۳	۲۲/۱	۸۱	۷۷/۹	

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۲: پراکندگی جغرافیایی آکانتامبا در آب های سطحی شهرستان های مختلف استان چهارمحال و بختیاری

در مطالعه حاضر بررسی توالی DNA نشان داد که از ۱۷ ژنوتیپ شناخته شده آکانتامبا در مناطق مختلف جهان، در آب های سطحی استان چهارمحال و بختیاری تنها سه ژنوتیپ T2، T4 و T5 وجود دارد. تجزیه و تحلیل یافته های مطالعه حاضر با استفاده از آزمون دقیق فیشر نشان داد که بین میزان فراوانی ژنوتیپ های موجود آکانتامبا و شهرستان های مختلف (P=۰/۲۶۶) و همچنین منابع مختلف آب های سطحی (P=۰/۶۵۵) ارتباط آماری معنی داری وجود ندارد (جدول های شماره ۵ و ۶).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۵: توزیع فراوانی ژنوتیپ های آکانتامبا در آب های سطحی استان چهارمحال و بختیاری بر حسب شهرستان

ژنوتیپ / شهرستان	T4		T5		T2		P
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	
شهرکرد	۷	۸۷/۵	۱	۱۲/۵	۰	۰	
کیار	۲	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	
فارسان	۲	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	
کوهرنگ	۱	۳۳/۳	۰	۰	۲	٦٦/۷	۰/۲٦٦
بروجن	٤	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	
سامان	۱	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	
لردگان	۱	۵۰	۰	۰	۱	۵۰	
بن	۱	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	
اردل	۰	۰	۰	۰	۰	۰	
جمع	۱۹	۸۲/٦	۱	٤/۳	۳	۱۳/۰	

*: آزمون دقیق فیشر.

جدول شماره ۶: توزیع فراوانی ژنوتیپ های آکانتامبا در آب های سطحی استان چهارمحال و بختیاری بر حسب منبع نمونه گیری

ژنوتیپ / منبع نمونه برداری	T4		T5		T2		P
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	
چشمه	۱۰	۷٦/۹	۰	۰	۳	۲۳/۱	
قنات و آبراه های کشاورزی	۲	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	
میادین عمومی	۳	۷۵	۱	۲۵	۰	۰	
استخر پارک	۲	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۰/٦۵۵
آبگیر	۱	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	
چاه	۱	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	
جمع	۱۹	۸۲/٦	۱	٤/۳	۳	۱۳/۰	

*: آزمون دقیق فیشر.

بحث:

آمیب های آزادزی در خاک و آب انتشار گسترده ای دارند. برخی از این آمیب ها همانند نگلریا فاولری، گونه هایی از آکانتامبا، بالاموثیا ماندریلاریس و اخیراً ساپینیا دیپلوئیدیا به عنوان آمیب های فرصت طلب بیماری زا در انسان شناخته شده اند. از زمان توصیف اولین مورد کشنده منگوآنسفالیت آمیبی نگلریایی در سال ۱۹۶۵، موارد کشنده بسیار بیشتری از این آمیب گزارش گردیده است. علاوه بر این، گزارش موارد آنسفالیت آمیبی گرانولوماتوز، عفونت های چشمی، عفونت های گوش، بینی، پوست و ارگان های داخلی

www.SID.ir

Archive of SID

ناشی از آکانتامبا نیز در سال های اخیر رشد فزاینده ای داشته است (۱۸،۱۷).

در حال حاضر برای شناسایی آکانتامبا در نمونه های بالینی و محیطی روش های مختلفی از قبیل روش های انگل شناسی (مشاهده میکروسکوپی و کشت)، بیوشیمیایی، ایمونولوژی و مولکولی مورد استفاده قرار می گیرد که حساسیت و ویژگی تشخیصی هر یک از این روش ها با یکدیگر متفاوت گزارش شده است (۱۹).

در مطالعه حاضر تمامی ۱۰۴ نمونه ای که روی محیط آگار غیر مغذی کشت شده بودند، پس از مدتی در محیط رشد یافته بودند. با توجه به این که آب یکی از محیط های بسیار مناسب جهت رشد و ادامه حیات طیف وسیعی از آمیب های آزادزی به شمار می رود (۲۳-۲۰)، مثبت شدن کشت کلیه نمونه ها روی محیط آگار غیر مغذی دور از انتظار نبود. به همین دلیل متمایز ساختن آمیب های رشد یافته از یکدیگر منحصراً، با استفاده از روش کشت دشوار و در بسیاری از موارد غیر ممکن است. در چنین شرایطی تکیه بر مشاهدات میکروسکوپی و بررسی تفاوت های ریخت شناسی این آمیب ها تا حدودی می تواند راه گشا باشد. در بررسی میکروسکوپی، ۶۶ نمونه از ۱۰۴ نمونه های رشد یافته در محیط کشت از نظر وجود کیست یا تروفوزوئیت های آکانتامبا مثبت تشخیص داده شد. با این حال، بر اساس شواهد موجود اثبات وجود ماده ژنتیکی آکانتامبا در آب و سایر نمونه های محیطی یا بالینی قطعی ترین راه برای تشخیص دقیق ارگانیسم می باشد (۲۵،۲۴). مطالعات انجام شده در نواحی مختلف جهان نشان دهد که فراوانی گونه های آکانتامبا در منابع آبی مختلف با یکدیگر متفاوت است. به طوری که فراوانی این آمیب در آب رودخانه های آمریکا، جامائیکا، آلمان، بلغارستان به ترتیب، ۷، ۲۶/۴، ۷۹ و ۹۴٪ و در آب های خانگی نیکاراگوئه، اسپانیا، ژاپن، برزیل و مکزیک به ترتیب ۲۱، ۲۲/۵، ۲۶/۳، ۳۶/۱ و ۵۹/۵٪ گزارش گردیده است (۳۱-۲۶). در ایران نیز مطالعه روی منابع مختلف آبی با استفاده از روش های کشت، میکروسکوپی و مولکولی نشان دهنده میزان های فراوانی متفاوتی از این آمیب است. به طوری که افتخار و همکاران میزان فراوانی گونه های مختلف آکانتامبا در آب های سطحی شهر تهران را بر اساس کشت ۵۹٪ گزارش نمودند (۱۶). آقاجانی و همکاران نیز میزان فراوانی گونه های مختلف آکانتامبا در آب استخرها و دریاچه های بخش سیستان را بر اساس یافته های کشت ۸۹/۲٪ و خضری و همکاران در آب رودخانه ها و آب های آشامیدنی آذربایجان این میزان را ۴۵٪ گزارش نموده اند (۳۲،۳۳). با این حال، محمودی و همکاران فراوانی گونه های آکانتامبا در آب میادین و استخر پارک های مشهد در ۶۱ نمونه را با استفاده از روش کشت و رنگ آمیزی ۶/۶۱٪ گزارش کردند (۳۴). مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعات فوق نشان می دهد که میزان فراوانی گونه های مختلف آکانتامبا در نواحی جغرافیایی و منابع آبی مختلف متفاوت است. از عمده ترین علل این تفاوت ها می توان به شرایط متفاوت بوم شناختی، اقلیمی و آب و هوایی و منابع آبی مختلفی اشاره کرد که در نواحی مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است.

از سویی، رشد طیف وسیعی از آمیب های آزادزی در محیط کشت اگار غیر مغذی و ریخت شناسی مشابه برخی از آن ها با یکدیگر نمی تواند روش قابل تکیه ای برای شناسایی دقیق آکانتامبا محسوب شود. در چنین شرایطی روش های مولکولی به علت حساسیت و ویژگی تشخیصی بالا آزمون تأییدی مناسبی جهت تمایز و تعیین هویت آکانتامبا از سایر آمیب های آزادزی موجود در نمونه های محیطی و بالینی محسوب می شود (۱۹). در این مطالعه آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز نشان داد که از ۱۰۴ نمونه مورد بررسی تنها در ۲۳ نمونه (۲۲/۱٪) شواهد ژنتیکی گونه های آکانتامبا وجود دارد. بررسی مطالعات انجام شده در مناطق مختلف جهان و ایران نیز نشان دهنده آن است که میزان های فراوانی آکانتامبا در منابع مختلف آبی بر اساس روش های مورد

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده با یکدیگر متفاوت است. به طوری که افتخار و همکاران میزان فراوانی گونه های این آمیب در نمونه آب های سطحی را با روش های کشت و مولکولی به ترتیب، ۵۹٪ و ۲۷/۳٪،آقاجانی و همکاران در آب استخرها و دریاچه های سیستان با روش کشت و مولکولی به ترتیب، ۸۹/۲٪ و ۴۶/۳٪ و خضری و همکاران در آذربایجان در آب رودخانه و آب لوله کشی با روش کشت و مولکولی به ترتیب، ۴۵٪ و ۴۰٪ گزارش نمودند (۳۳،۳۲،۱۶). مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات یاد شده در این زمینه موید آن است که روش های انگل شناسی، روش های تشخیصی مناسبی جهت غربالگری اولیه نمونه های محیطی یا بالینی بوده و برای تشخیص دقیق میکروارگانیسم موجود در نمونه استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس آکانتامبا راه گشاست.

از نظر فراوانی ژنوتیپ های مختلف آکانتامبا در مناطق مختلف جهان و منابع محیطی متفاوت تاکنون قریب ۱۷ ژنوتیپ از این آمیب شناسایی شده است که هر یک از آن ها از فراوانی و پراکندگی متفاوتی برخوردار می باشند. در این مطالعه از مجموع ژنوتیپ های شناخته شده آکانتامبا تنها ۳ ژنوتیپ T2، T4 و T5 در آب های سطحی استان شناسایی گردید که فراون ترین آن ژنوتیپ T4 آکانتامبا بود. آقاجانی و همکاران نیز در منابع آبی سیستان وجود سه ژنوتیپ T4، T5 و T3 را با میزان های فراوانی به ترتیب، ۸۹/۴۷، ۷/۹ و ۲/۶۳٪ گزارش نمودند (۳۲). همچنین، راهدار و همکاران در اهواز در نمونه های آب و خاک وجود سه ژنوتیپ T4، T2 و T5 را به ترتیب، با میزان های فراوانی ۸۶/۶، ۶/۶ و ۶/۶٪ گزارش کردند (۳۵). در مطالعه خضری و همکاران در آذربایجان ژنوتیپ T4 آکانتامبا به عنوان فراوان ترین ژنوتیپ ارگانیسم در آب رودخانه و آب آشامیدنی گزارش گردید (۳۳). محمودی و همکاران نیز ژنوتیپ T4 آکانتامبا را از آب های سطحی استان های گیلان، مازندران، البرز و تهران به عنوان ژنوتیپ غالب در بین ژنوتیپ های آکانتامبا گزارش نمودند (۳۶). با این حال، مقصود و همکاران در انگلستان و ایران در کراتیت های آکانتامبایی و آب استخر ژنوتیپ T2 آکانتامبا را به عنوان فراوان ترین ژنوتیپ این ارگانیسم معرفی نمودند (۳۷). مقایسه نتیجه مطالعه حاضر و مطالعات فوق می تواند نشان دهنده آن باشد که از ۱۷ ژنوتیپ گزارش شده آکانتامبا، در ایران تنها تعداد معدودی از ژنوتیپ های آن در نمونه های محیطی وجود دارد که غالب ترین آن ها ژنوتیپ T4 آکانتامبا است. متفاوت بودن نتایج مطالعه حاضر با مطالعه مقصود و همکاران در انگلستان می‌تواند به علت متفاوت بودن منابع آبی بررسی شده و روش های مولکولی مورد استفاده باشد. با این وجود، اظهار نظر قطعی در مورد کلیه ژنوتیپ های موجود این آمیب در منابع محیطی مناطق مختلف ایران مستلزم انجام مطالعات بیشتر است. بر اساس شواهد موجود ژنوتیپ T4 آکانتامبا در مقایسه با سایر ژنوتیپ های آن سهم بیشتری در ایجاد عفونت های انسانی داشته است (۳۸). بنابراین، فراوانی بیشتر ژنوتیپ مذکور در منابع آبی و سهم برجسته تر آن در ایجاد عفونت های انسانی می تواند از نقطه نظر بهداشتی حائز اهمیت باشد.

اگرچه در مورد ارتباط میزان فراوانی آکانتامبا و منابع نمونه گیری مطالعات چندانی وجود ندارد، اما با این وجود، در این مطالعه بین میزان فراوانی آکانتامبا و منابع نمونه گیری (چاه، چشمه، رودخانه و ...) ارتباط آماری معنی داری مشاهده نشد. این یافته با نتایج گزارش شده توسط Ramirez و همکاران در مکزیک همخوانی دارد (۳۹). با این حال، نتایج مطالعه حاضر با یافته های مسیبی و همکاران در اراک که روی نمونه های آب قنات ها صورت پذیرفته متفاوت است (۴۰). شاید از علل این عدم همخوانی بتوان به متفاوت بودن شرایط اقلیمی و روش های متفاوتی که در دو مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است اشاره نمود.

در این مطالعه همچنین، بین میزان فراوانی آکانتامبا و سرعت جریان آب در محل نمونه برداری ارتباط آماری معنی داری مشاهده نشد. با این حال، در مطالعه ای که توسط بهروان و همکاران در بیرجند

www.SID.ir

Archive of SID

صورت گرفت، محققین مذکور ادعا نمودند که فراوانی آکانتامبا در آب های راکد به طور معنی داری بیشتر از آب های جاری بوده است (۴۱). در توجیه این تفاوت می توان ادعا نمود که علاوه بر سرعت جریان آب، عوامل دیگری از قبیل، نوع میکروارگانیسم های موجود در آب های هر منطقه که آکانتامبا از آن به عنوان منبع تغذیه استفاده می نماید، دمای آب، منبع آب و برخی از عوامل دیگر که به خوبی شناخته نشده اند نیز در میزان وفور این آمیب نقش دارد.

اگرچه در مورد مقایسه میزان فراوانی آکانتامبا در مناطق شهری و روستایی اطلاعات چندانی وجود ندارد، اما در مطالعه حاضر بین میزان فراوانی آکانتامبا در نمونه های آب شهری و روستایی ارتباط آماری جزئی مشاهده شد. به طوری که میزان فراوانی آکانتامبا در آب های شهری تا اندازه ای بالاتر از روستا بود. با این حال، در مطالعه ای مسیبی و همکاران در اراک در درصد بالایی از آب های روستایی آکانتامبا وجود داشته است (۴۰). از علل دخیل در این عدم همخوانی شاید بتوان به روش های متفاوت مورد استفاده جهت انجام مطالعه و همچنین شرایط اقلیمی و بوم شناختی متفاوت در مناطق شهری و روستایی دو منطقه اشاره نمود.

در این مطالعه همچنین، میزان فراوانی آکانتامبا در آب های سطحی شهرستان های مختلف به طور معنی داری متفاوت بود. اگرچه یافته های مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی آکانتامبا در آب های سطحی شهرستان کیار بیشتر از سایر شهرستان های مورد مطالعه بود، اما با توجه به حجم کم نمونه های بررسی شده در این شهرستان لازم است این یافته ها با احتیاط بیشتری مورد استفاده قرار گیرد و در این زمینه برای حصول اطمینان از نتیجه به دست آمده مطالعه بر روی تعداد نمونه بیشتری مورد نیاز است. این یافته تا حدودی با نتایج گزارش شده توسط نیتی و همکاران در مناطق مختلف کیش همخوانی دارد. به طوری که این محققین بیشترین میزان فراوانی آکانتامبا را در قسمت های شمالی این جزیره گزارش نموده اند (۴۲). احتمال می رود تفاوت های آب و هوایی موجود در مناطق مختلف استان و تنوع میکروارگانیسم هایی موجود در آب های سطحی این مناطق که آکانتامبا از آنان تغذیه می کند یکی از علل این تفاوت ها باشد.

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان می دهد که در آب های سطحی استان گونه ها و ژنوتیپ های خاصی از آکانتامبا (T4) وجود دارند که برخی از آن ها می توانند در شرایط ویژه ای برای افرادی از قبیل بیماران مبتلا به ایدز، بیماران دریافت کننده کورتیکواستروئیدها و سایر بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی مخاطره آمیز باشند. از سویی، با توجه به فراوانی بیشتر گونه های این آمیب در منابع آبی شهرستان کیار لازم است برای ارتقای آگاهی های عمومی اطلاعات لازم از طریق مراکز بهداشتی در اختیار مردم و پزشکان قرار داده شود.

تشکر و قدردانی:

این مقاله منتج از پایان نامه کد (۱۳۹۵-۰۱-۷۰-۲۹۰۰) در رشته کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی مورخ ۱۳۹۵/۱۰/۲۶ دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد می باشد. بدینوسیله از حمایت های مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری نموده اند، سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع:

1. David TJ. Opportunistic amoebae. In: Cox F.E.G; Wakelin D; Gillespie SH; Despommier DD. Topley and Wilson’s Microbiology and Microbial Infections. Parasitology.10th ed. USA: Edward Arnold Pub, Ltd. Washington, D.C: 226; 2005.

www.SID.ir

Archive of SID

2. Axelsson-Olsson D, Waldenstrom J, Broman T, Olsen B, Holmberg M. Protozoan Acanthamoeba polyphaga as a potential reservoir for Campylobacter jejuni. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(2): 987-92.
3. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(2): 413-33.
4. Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, Levi Y. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. J Appl Microbiol. 2004; 97(5): 950-63.
5. Garcia L, Bruckner D. Diagnostic medical parasitology. USA: American Society for Microbiology, Washington, DC); 1997.
6. Marciano-Cabral F, Cabral G. Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(2): 273-307 .
7. 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.
8. Lorenzo-Morales J, Monteverde-Miranda CA, Jimenez 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.
9. 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; 50(1): 1-26.
10. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, et al. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. J Clin Microbiol. 2001; 39(5): 1903-11.
11. Gg 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.
12. Statistical center of IRAN. Management and planning organization. Available from: http://www.amar.org.ir/default.aspx?tabid=667&fid=6899#dltop.
13. Omidvar SH, Sedghi L. Geography of Chaharmahal and Bakhtiari province. Tehran: Publishing text books for students; 2013.
14. Geographical position of Chaharmahal va Bakhtiari province (2016). http://www. chaharmahalmet.ir/en/c1.asp.
15. Rezaeian M, Niyyati M, Farnia S, Haghi AM. Isolation of Acanthamoeba spp. from different environmental sources. Iran J Parasitol. 2008; 3(1): 44-7.
16. Eftekhar M, Nazem AME, Haghighi A, Sharifi K, Nouchi Z, Athari A. Detection of Acanthamoeba from fresh water using polymerase chain reaction. Pajouhesh Dar Pezeshki . 2009; 33(1): 39-42.
17. Szenasi Z, Endo T, Yagita K, Nagy E. Isolation, identification and increasing importance of 'free-living' amoebae causing human disease. J Med Microbiol. 1998; 47(1): 5-16.
18. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, et al. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. Pathol Biol. 2012; 60(6): 399-405.
19. Lass A, Guerrero M, Li X, Karanis G, Ma L, Karanis P. Detection of *Acanthamoeba* spp. in water samples collected from natural water reservoirs, sewages, and pharmaceutical factory drains using LAMP and PCR in China. Sci Total Environ. 2017; 584-585: 489-94.
20. Grimm D, Ludwig WF, Brandt BC, Michel R, Schleifer KH, Hacker J, et al. Development of 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes for specific detection of Hartmannella and Naegleria in Legionella-positive environmental samples. Syst Appl Microbiol. 2001; 24(1): 76-82.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Ettinger MR, Webb SR, Harris SA, McIninch SP, G CG, Brown BL. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. Parasitol Res. 2003; 89(1): 6-15.
22. Kuiper MW, Wullings BA, Akkermans AD, Beumer RR, van der Kooij D. Intracellular proliferation of Legionella pneumophila in Hartmannella vermiformis in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(11): 6826-33.
23. Page FC. A new key to freshwater and soil gymnamoebae: with instructions for culture: Freshwater Biological Association; 1988.
24. Vodkin MH, Howe DK, Visvesvara GS, McLaughlin GL. Identification of Acanthamoeba at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. J Protozool. 1992; 39(3): 378-85.
25. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, et al. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. Parasitol Res. 2004; 92(5): 405-13.
26. 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.
27. Leiva B, Clasdotter E, Linder E, Winiecka-Krusnell J. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amebae in water sources of Leon, Nicaragua. Rev Biol Trop. 2008; 56(2): 439-46.
28. Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martinez E, Valladares B. Isolation and identification of pathogenic Acanthamoeba strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. Parasitol Res. 2005; 95(4): 273-7 .
29. 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.
30. 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.
31. Bonilla-Lemus P, Ramirez-Bautista GA, Zamora-Munoz C, Ibarra-Montes Mdel R, Ramirez-Flores E, Hernandez-Martinez 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.
32. 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 Parazitol Derg. 2016; 40(3): 132-6.
33. Khezri A, Fallah E, Mostafazadeh M, Spotin A, Shahbazi A, Mahami-Oskouei M, et al. Molecular and Morphometric *Characterization* of *Acanthamoeba* spp. from different water sources of Northwest Iran as a Neglected focus, co-bordered with the country of Iraq. Jundishapur J Microbiol. 2016; 9(11): e38481.
34. Mahmoudi MR, Berenji F, Fata A, Najafzadeh MJ, Asadian A, Salehi M. Morphological characterization of potentially pathogenic thermophilic amoebae isolated from surface water in mashhad, iran. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(4): e25944.
35. Rahdar M, Niyyati M, Salehi M, Feghhi M, Makvandi M, Pourmehdi M, et al. Isolation and genotyping of acanthamoeba strains from environmental sources in ahvaz city, khuzestan province, southern iran. Iran J Parasitol. 2012; 7(4): 22-6.
36. Mahmoudi MR, Rahmati B, Seyedpour SH, Karanis P. Occurrence and molecular characterization of free-living amoeba species (Acanthamoeba, Hartmannella, and Saccamoeba limax) in various surface water resources of Iran. Parasitol Res. 2015; 114(12): 4669-74.

www.SID.ir

Archive of SID

37. 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.
38. Hajialilo E, Behnia M, Tarighi F, Niyyati M, Rezaeian M. Isolation and genotyping of Acanthamoeba strains (T4, T9, and T11) from amoebic keratitis patients in Iran. Parasitol Res. 2016; 115(8): 3147-51.
39. Ramirez E, Robles E, Martinez B, Ayala R, Sainz G, Martinez ME, et al. Distribution of free-living amoebae in a treatment system of textile industrial wastewater. Exp Parasitol. 2014; 145 Suppl: S34-8.
40. Mosayebi M, Ghorbanzadeh B, Rod Islam Z, Ijtihad Far M, Rastad B. Free-living amoeba Acanthamoeba in water resources, rural isolation and detection of Arak city. Med Lab J Gorgan Univ Sci. 2013; 7(7): 66-71.
41. Behravan M, Malekaneh M, Mesbahzadeh B, Sharifzadeh G, Namaei MH, Behniafar H, et al. Microscopic isolation and characterization of free living amoebae (FLA) from surface water sources. in Birjand, the capital city of the South Khorasan. J Birjand Univ Med Sci. 2015; 22(2): 161-8.
42. Niyyati M, Lasgerdi Z, Lorenzo-Morales J. Detection and molecular characterization of potentially pathogenic free-living amoebae from water sources in Kish Island, Southern Iran. Microbiol Insights. 2015; 8(1): 1-6.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2018; 20(5): 101-115.

Original article

Isolation, detection and genotyping of Acantamoeba spp. in surface waters of Chaharmahal and Bakhtiari province in 2016-2017

Khodabakhshi S[1]., Manouchehri Naeini K[1], Abdizadeh R[1], Kheiri S[2], Parchami S[3]
[1]Parasitology Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; [2]Epidemiology and Biostatistics Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; [3]Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.
Received: 12/Jun/2017 Accepted: 30/7/2018

Background and aims: Members of the genus Acanthamoeba are free-living amoebae with a widespread distribution in environments, including surface waters and soil. Some of Acanthamoeba species are able to produce various human diseases such as Granulomatous Amoebic Encephalitis (GAE), keratitis, and skin lesions. Awareness of Acanthamoeba spp.distribution in environmental sources, particularly surface waters can provide valuable information for physicians and health experts. The aim of present study was to isolate, detect, and genotype of Acanthamoeba in surface waters.

Methods: In this analytical and descriptive study one hundred and four water samples collected from different surface water resources of Chaharmahal and Bakhtiari province were studied by using culture, microscopy and the molecular methods, polymerase chain reaction, and sequencing. The data were analyzed by the SPSS ver. 20 software and the statistical tests, Fischer's exact test, McNemar and Chi- square. The values $P<0.05$ were considered significant.

Results: Although all of the samples had been grown on non-nutrient agar, the microscopic examinations and PCR revealed that only 63.46% and 22.1% of these Amoebae were Acanthamoebaspp., respectively. The Fischer's exact test showed that the frequency of Acanthamoeba was significantly different between districts ($P=0.034$). According to the Chi-square test there was also a partial relationship between the frequency of Acanthamoeba in urban and rural areas ($P=0.059$).The sequencing of Acanthamoeba DNA showed that T2, T4, and T5 genotypes of the organism, were present in the samples and of these T4 genotype of Acanthamoebawas more prevalent.

Conclusion: The present study indicates that different species and genotypes of Acanthamoba are present in surface waters of this area and respect to the potential hazard of Acanthamoeba spp. for human, particularly in immunedeficient patients, physicians should be aware of this potential environmental risk.

Keywords: **Acanthamoeba, Chaharmahal and Bakhtiari, surface waters, culture, Genotype.**

Cite this article as: Khodabakhshi S, Manouchehri Naeini K, Abdizadeh R, Kheiri S, Parchami S. Isolation, detection and genotyping of Acantamoeba spp. in surface waters of Chaharmahal and Bakhtiari province in 2016-2017. J Shahrekord Univ Med Sci. 2018; 20(5): 101-115.

[*]**Corresponding author:**
Parasitology Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 0098383335635, E-mail: manouchahri@yahoo.com

www.SID.ir