مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی آمیب‌های آزادزی (نگلریا و آکانتامبا) در منابع آب شیراز بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی

نویسندگان:

شکوفه قدرقدر جهرمی[۱]، کاوس صلح‌جو*[۲]، محمدجواد نوروزنژاد[۳]، ریحانه روحی[۲]، سمانه ضیاء جهرمی[۴]

۱- آزمایشگاه میکروبیولوژی، شرکت آب و فاضلاب شیراز، شیراز، ایران
۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران
۳- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران
۴- گروه زمین‌شناسی- آب‌شناسی، دانشگاه پیام نور، جهرم، ایران

Journal of Jahrom University of Medical Sciences, Volume 10, Number 3, Fall 2012

چکیده:

مقدمه: آمیب‌های آزادزی، آمیب‌های فرصت‌طلبی هستند که معمولاً به صورت آزاد در شرایط محیطی مختلف از جمله آب‌های گرم زمین و آب‌های گرم آلوده و حتی در لوله‌های شبکه آب‌رسانی زندگی می‌کنند. این آمیب‌ها هنگامی که به طور اتفاقی وارد بدن انسان یا حیوان می‌شوند، می‌توانند بیماری‌های خطرناکی ایجاد کنند. بنابراین شناسایی و تشخیص وجود آن‌ها در منابع آب با توجه به خطری که برای سلامتی انسان دارند ضروری به نظر می‌رسد.

روش کار: در این مطالعه، پس از نمونه‌برداری از ۷۰ حلقه چاه، ۳۰ مخزن و ۲۰ شبکه توزیع آب در شش ماه اول ۱۳۸۹، پارامترهای فیزیکی، شیمیایی و میکروبی آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها روی محیط آگار غیرمغذی کشت داده شدند و پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا و استفاده از ویژگی‌های مورفولوژی، آمیب‌های رشدیافته شناسایی شدند.

یافته‌ها: از ۱۲۰ نمونه آب بررسی‌شده، نتیجه آزمایش۴۲ نمونه (۳۵ درصد) از نظر وجود آمیب‌های آزادزی مثبت بود. از ۴۲ نمونه آلوده به آمیب،۳۱ نمونه (۷۳/۸۱ درصد) به یک نوع آمیب و ۱۱ نمونه (۲۶/۱۹ درصد) به دو نوع آمیب آلودگی داشتند و فراوانی گونه‌های آکانتامبا (۳۹ مورد) نسبت به نگلریا (۱۴ مورد) بیش‌تر بود. همچنین چاه‌ها از سایر منابع آلوده‌تر بودند (۴۴/۴ درصد). به علاوه با بررسی میکروسکوپی، چهار نوع آمیب پاتوژن (Naegleria fowleri، Acanthamoeba polyphaga، A.castellani و A.astronyxis) شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که منابع آب شیراز حاوی آمیب‌های آزادزی بیماری زا می‌باشند. بنابراین ضروری است با به‌کارگیری روش‌های جدید ضدعفونی و تصفیه منابع آب، از آلودگی احتمالی آن‌ها با این آمیب‌ها و عوامل عفونت‌زا جلوگیری نمود.

واژگان کلیدی: آمیب، آکانتامبا، نگلریا، منابع آب، مورفولوژی

J Jahrom Univ Med Sci 2012; 10(3):33-41

مقدمه:

آمیب‌های آزادزی، آمیب‌های فرصت طلبی هستند که معمولاً به صورت آزاد در آب‌های شور و شیرین، آب دریاها، خاک‌های مرطوب، روی گیاهان در حال فساد و... زندگی می‌کنند [۱]. این آمیب‌ها در آب‌های سطحی باز از قبیل منابع تأمین آب به فراوانی یافت می‌شوند، اما بیش‌ترین تعداد آن‌ها در محیط‌های سرشار از مواد مغذی همچون سیستم‌های تصفیه بیولوژیکی فاضلاب، جایی که فعالیت‌های تغذیه‌ای باکتریایی وجود دارد، یافت می‌شوند. تک‌یاخته‌های آزادزی در محدوده گسترده‌ای از شرایط محیطی در محیط‌های آبی از آب‌های گرم

* نویسنده مسئول، نشانی: جهرم، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی
تلفن تماس: ؟؟؟ پست الکترونیک: solhjouk@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۵/۱۵ تاریخ اصلاح: ۱۳۹۰/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۲/۰۴

SID.ir

زمین و آب‌های گرم آلوده تا لوله‌های شبکه آب‌رسانی حضور دارند. [۲]. بعضی از این آمیب‌ها از نظر سلامتی خطر دارند. در سال‌های اخیر با توجه به پیشرفت‌هایی که در روش‌های تشخیص آزمایشگاهی این آمیب‌ها حاصل شده است، موارد گزارش‌شده رو به افزایش نهاده است [۳]. این تک‌یاخته‌ها با وجودی که در سیر زندگی خود اصولاً هیچ مرحله انگلی ندارند، ولی وقتی به طور اتفاقی وارد بدن انسان یا حیوان می‌شوند، در آن جا مستقر شده و تکثیر می‌کنند و بدین ترتیب باعث بروز مشکلاتی برای انسان و حیوان می‌شوند [۱].

نگلریا و آکانتامبا از شناخته‌شده‌ترین آمیب‌های آزادزی بیماری‌زای فرصت‌طلب، هستند. عفونت حاصل از نگلریافولری به شدت ناشی از آب است و می‌تواند باعث یک عفونت مغزی نادر اما کشنده موسوم به مننگوآنسفالیت آمیبی اولیه شود. گونه‌های آکانتامبا معمولاً در خاک و آب یافت می‌شوند و باعث ایجاد بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی یا آنسفالیت آمیبی گرانولوماتوزی و یک بیماری چشمی به نام کراتیت آمیبی می‌شوند [۲]. موارد آنسفالیت آمیبی گرانولوماتوزی ناشی از گونه‌های مختلف آکانتامبا به ویژه آکانتامبا کاستلانی و آکانتامبا کولبرتسونی در افراد مبتلا به بیماریهای مزمن گزارش شده است. بیماری کراتیت آمیبی می‌تواند ناشی از گونه های متعدد آکانتامبا به ویژه آکانتامبا کاستلانی و آکانتامبا پلی‌فاگا باشد [۱ و ۴]. این آمیب‌ها همچنین می‌توانند حامل و ناقل باکتری‌های مهم و بیماری‌زایی از قبیل ویبریو کلرا، لژیونلا، میکوباکتریوم لپرا، لیستریا مونوسیتوژنز، فرانسیسلا تولارنسیس، هلیکوباکتر پیلوری و اشرشیا کلی سروتایپ O157 باشند و در نتیجه احتمال انتقال این عوامل بیماری زا از طریق منابع آب به انسان توسط این آمیب‌ها وجود دارد [۵].

مطالعات متعددی در دنیا برای شناسایی آمیب‌های آزادزی انجام شده است. در ایران با بررسی نمونه‌های آب و خاک رودخانه‌ها و دریاچه پریشان در منطقه کازرون [۶]، آب‌های سطحی و میادین شهر تهران [۷] و نمونه آب شیر بیمارستان‌ها [۸] آلودگی به آکانتامبا و نگلریا گزارش شده است. همچنین آلودگی به آمیب‌های آزادزی از منابع آب، مخازن، تانکرها و بخش‌های مختلف بیمارستانی در کشور پرتغال [۹]، از آب چاه و آب شیر در نیکاراگوآ [۱۰]، از نمونه آب خانگی در فلوریدا [۱۱]، از آب آشامیدنی در اوزکای ژاپن [۱۲] و از تصفیه خانه های آب آشامیدنی در سوئیس [۱۳] گزارش شده است.

تکثیر و رشد آمیب‌های آزادزی در محیطهای کشت، امکان مطالعه این تک‌یاخته‌ها را فراهم کرده است. انتخاب محیطهای کشت بستگی به هدف مطالعه برای جداسازی و نگهداری استرین یا تعیین مشخصات بیوشیمیایی و خواص آنتی‌ژنیک یک استرین خاص دارد [۱۴]. مشاهده کیست و تروفوزوئیت آمیب با میکروسکوپ نوری و اینورت، رنگ‌آمیزی تری‌کروم، هماتوکسیلین- ائوزین و گیمسا، آنالیز ایزوآنزیمی، روش آنتی-بادی فلئورسانس غیر مستقیم با استفاده از آنتی سرم اختصاصی [۱۴] و روش‌های مولکولی از قبیل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز [۱۵ و ۱۶]، PCR-RFLP و تعیین توالی [۱۶-۱۸] از روش‌های شناسایی آمیب‌های آزادزی است.

با توجه به خطر و نقش این آمیب‌ها در گسترش میکروارگانیسم های بیماری‌زا در منابع آب، می‌توان با شناسایی منابع آلوده اقدام موثر برای حذف یا کنترل آن‌ها انجام داد و بدین ترتیب از بیماری‌های احتمالی ناشی از آن‌ها و یا باکتری‌های حمل شده توسط آن‌ها پیشگیری کرد. این تحقیق به منظور شناسایی آمیب‌های آزادزی در منابع آب شیراز به روش کشت و بررسی میکروسکوپی بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی انجام شد.

روش کار:

در این مطالعه مقطعی- توصیفی از ۷۰ حلقه چاه، ۳۰ مخزن و ۲۰ شبکه توزیع آب در تمام مناطق شیراز بین دی ماه ۱۳۸۸ تا شهریور ماه ۱۳۸۹ به وسیله بطری‌های استریل ۵۰۰ میلی‌لیتری نمونه‌برداری شد. روی بطری‌ها تاریخ و محل نمونه‌برداری درج و در ظرف مخصوص حمل نمونه به آزمایشگاه منتقل شدند. همچنین در محل نمونه‌برداری دمای آب و کلر باقیمانده با دستگاه اندازه‌گیری شد. به علاوه هم‌زمان با کشت نمونه‌ها برای شناسائی آمیب‌های موجود، آزمایش‌های کلیفرم به روش بیش‌ترین تعداد محتمل در زیر هود لامینار، کدورت به روش نفلومتری، pH، سختی کل، هدایت الکتریکی، نیتریت، نیترات و آمونیاک آب ها مطابق با روش استاندارد مرجع آزمایشات ۲۰۰۵ سازمان آبفا انجام شد. مقادیر کلیه پارامترهای فیزیکی، شیمیایی و میکروبی در همان روز نمونه‌برداری اندازه‌گیری شد [۱۹].

برای کشت آمیب‌ها از محیط کشت آگار غیرمغذی استفاده شد [۱۴ و ۲۰]. پس از تهیه محیط کشت، یک کلنی از باکتری اشرشیاکلی سویه K12 که قبلاً کشت داده شده بود، در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر حل شد و دو تا سه قطره از این سوسپانسیون به محیط کشتی که در پلیت ریخته شده بود، تلقیح شد (باکتری به عنوان منبع غذایی برای انگل در سطح محیط کشت پخش می‌شود). سپس با تکان دادن محتوی بطری نمونه‌برداری به منظور یکنواخت شدن نمونه، مقدار ۲۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌لیتر از نمونه آب، از پارچه تنظیف استریل سه لایه به منظور حذف پلانکتون‌های احتمالی عبور داده شد. نمونه آب با استفاده از دستگاه پمپ خلاء و فیلترهای کاغذی استریل نیتروسلولزی با منافذ ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد. سپس فیلتر به وسیله پنس

Archive

www.SID.ir

استریل و در کنار شعله به صورت وارونه روی محیط کشت آگار غیر مغذی که سطح آن با اشرشیاکلی سویه K12 پوشیده شده بود، قرار داده شد. اطراف پلیت با پارافیلم مسدود و سپس محیط‌ها در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. به منظور تشخیص آمیب از روز دوم هر روز به مشاهده میکروسکوپی محیط‌های کشت مبادرت شد تا نمونه مثبت از نظر آمیب شناسائی شود (نقاط شفاف روی محیط کشت دال بر وجود آمیب است). معمولاً پس از گذشت چهار روز درون پلیت-های مثبت تعداد زیادی کیست و تروفوزوئیت مشاهده می‌شود. سایر نمونه‌ها نیز تا یک ماه بعد از شروع کشت هر روز با میکروسکوپ نوری و اینورت مورد بررسی قرار گرفتند و در زیر میکروسکوپ از آن‌ها عکس گرفته شد. در نهایت، بعد از گذشت یک ماه در صورت عدم مشاهده آمیب، نتیجه کشت منفی گزارش شد [۲۰ و ۲۱].

محیط‌های دارای اشکال متحرک یا اشکال شبیه کیست آمیب‌های آزادزی برای مراحل بعد انتخاب شدند. از آنجایی که در برخی از پلیت‌ها رشد مختلط مشاهده شد، برای به دست آوردن آمیب مربوط، کشت خالص تهیه شد. بدین ترتیب که با استفاده از میکروسکوپ یک یا چند کیست از آمیب که اطراف آن باکتری و قارچ کمتری داشت در نظر گرفته و با اسکالپل استریل، ژل محیط کشت بریده و به محیط کشت جدید منتقل شد. پلیت ها روزانه از نظر رشد آمیب مورد بررسی قرار گرفتند و این کار تا به دست آوردن یک پلیت خالص از آمیب مورد نظر ادامه یافت [۲۰ و ۲۱].

برای جمع‌آوری آمیب‌ها از سطح پلیت ابتدا با پی‌پت پاستور استریل، ۵-۴ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی استریل روی محیط کشت ریخته شد. سپس با استفاده از Cell scraper سطح پلیت به طور کامل با بافر مخلوط شد تا تروفوزوئیت‌ها و کیست‌ها در بافر غوطه‌ور شوند. در مرحله بعد تروفوزوئیت و کیست‌ها همراه بافر با پی‌پت پاستور به میکروتیوب انتقال داده شدند و با استفاده از دستگاه سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰ و زمان پنج دقیقه رسوب کافی از آمیب‌ها حاصل شد. برای حذف آگار اضافی این عمل تکرار شد تا بیش‌ترین مواد اضافی از آمیب جدا شوند [۱۴ و ۲۰].

برای شناسایی آمیب‌ها، نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از محیط‌های کشت با و بدون رنگ آمیزی با گیمسا در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی×۱۰، ×۴۰ و ×۱۰۰، بررسی و از تمام نمونه‌ها عکس گرفته شد. آمیب‌ها با توجه به ویژگی‌های مورفولوژی کیست‌ها و تروفوزوئیت‌ها شناسایی شدند [۲۲ و ۲۳].

داده های حاصل از آزمایش های فوق با کمک نرم افزار SPSS به شکل توصیفی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها:

در این تحقیق از ۱۲۰ نمونه جمع آوری شده، ۴۲ نمونه (۳۵ درصد) از نظر وجود آمیب های آزادزی مثبت بودند (جدول ۱). به طور کلی همه نمونه‌های آب از نظر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی در محدوده طبیعی قرار داشتند (جدول ۲). نتایج نشان داد که از ۴۲ نمونه مثبت از نظر دارا بودن آمیب‌های آزادزی، ۳۹ نمونه (۹۲/۸۵ درصد) فاقد باقیمانده کلر و ۳ نمونه (۷/۱۵ درصد) حاوی کلر باقیمانده بودند.

جدول ۱: فراوانی و درصد وضعیت نمونه ها از نظر وجود آمیب های آزادزی

تعداد محل نمونه‌گیری	وجود آمیب (درصد)	عدم وجود آمیب (درصد)	جمع (درصد)
چاه	۳۲ (۴۴/۴)	۳۸ (۵۶/۶)	۷۰(۱۰۰)
مخزن	۸ (۲۶/۶)	۲۲ (۷۴/۴)	۳۰(۱۰۰)
شبکه آبرسانی	۲ (۱۰)	۱۸ (۹۰)	۲۰(۱۰۰)
جمع	۴۲ (۳۵)	۷۸ (۶۵)	۱۲۰(۱۰۰)

بررسی میکروبی ۱۲۰ نمونه آب نشان داد که ۵۷ نمونه (۴۷/۵۰ درصد) از نظر کلیفرم کلی و ۲۹ نمونه (۲۴/۱۶ درصد) از نظر کلیفرم گرماپای مثبت بودند. پس از بررسی میکروبی ۴۲ نمونه آب حاوی آمیب‌های آزادزی مشخص شد که ۲۱ نمونه (۵۰ درصد) از نظر کلیفرم کلی و ۱۳ نمونه (۳۱ درصد) از نظر کلیفرم‌های گرماپای مثبت بودند، اما ارتباط معناداری بین آلودگی آب به آمیب‌های آزادزی و وجود کلیفرم ها مشاهده نشد ($P>0/05$).

Archive of SID

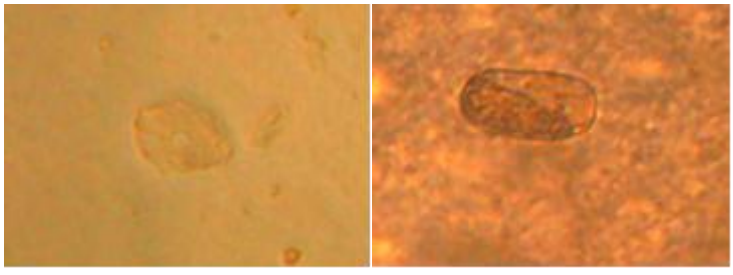
www.SID.ir

جدول ۲: میانگین، کم ترین و بیش‌ترین مقدار پارامترهای فیزیکی و شیمیایی نمونه های آب

شاخص / پارامتر	خطای استاندارد ± میانگین	کم‌ترین	بیش‌ترین
کدورت (NTU)	۰/۷۴۳ ± ۰/۰۹	۰/۱۲	۸/۲۵
کلر باقیمانده (ppm)	۰/۱۳۲ ± ۰/۰۲۶	۰	۱/۵
دما (C °)	۱۹/۵۴ ± ۰/۱۵	۱۲/۰	۲۹/۰
pH	۷/۵۴ ± ۰/۱۹۰	۶/۹۸	۷/۹۶
آمونیاک (mg/Liter)	۰/۱۰۳ ± ۰/۰۲۸	۰/۰۱	۳/۰
نیتریت (mg/Liter)	۰/۰۱۰ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۰۸
نیترات (mg/Liter)	۲۱/۲۰ ± ۱/۶۲	۳/۰	۶۷/۰
هدایت الکتریکی (µs)	۹۴۹/۶۹ ±۳۵/۲۱	۳۱۴/۱۰	۱۸۵۸/۰۰
سختی آب (mg/Liter)	۴۶۸/۳۲ ± ۵۲/۰۱	۱۶۰/۳۲	۵۸۲۶/۰۰

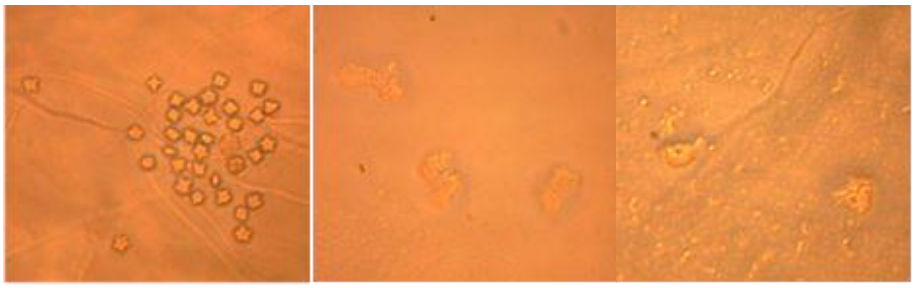
بررسی محیط‌های کشت با استفاده از میکروسکوپ نوری نشان داد که ۴۲ نمونه دارای شکل شبیه تروفوروئیت یا کیست آمیب-های آزادزی بودند. همچنین در مواردی، تروفوزوئیت‌های متحرک نگلریا و یا کیست‌های دو لایه آکانتامبا با دیواره خارجی چروکیده و دیواره داخلی زاویه‌دار و چندضلعی به راحتی قابل تشخیص بودند (شکل‌های ۱ و ۲). در بررسی میکروسکوپی لام‌های رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا نیز شکل‌های تروفوزوئیت و کیست نگلریا و آکانتامبا مشاهده شد (شکل‌های ۴ و ۵ و ۶). بررسی شکل‌های نگلریا نشان داد که فرم‌های آمیبی نگلریا بین ۲۵-۱۰ میکرون طول و دارای پای کاذب گرد بزرگ هستند و سیتوپلاسم دارای دانه‌های صاف و ریز و حاوی یک هسته واضح و برجسته و هستک مرکزی متراکم است که نمای هاله‌ای یا حلقه نور به آن می‌دهد (شکل‌های ۱ و ۳). فرم تاژکدار نیز دارای یک هسته و هستک‌های بزرگ و معمولاً دو تاژک جلویی ولی گاهی ۳ یا ۴ تاژک نیز دیده شد (شکل‌های ۱ و ۳). با بررسی لام‌های رنگ‌آمیزی‌شده آکانتامبا نیز مشخص شد که بعضی از این کیست‌ها دارای میانگین قطر بیش‌تر از ۱۸ میکرون و دیواره داخلی ستاره‌ای و دیواره خارجی صاف یا چروکیده هستند و تعداد بازوها کم‌تر از ۶ عدد است. بنابراین گونه موجود باید A.asteronyxis باشد [۲۳] (شکل ۴). همچنین بعضی از کیست‌ها دارای قطر میانگین کم تر از ۱۸ میکرون با دیواره داخلی چند ضلعی، سه وجهی، گرد، بیضوی یا ستاره‌ای و دیواره خارجی موجدار بودند که گونه‌های آکانتامبا در این دسته از نمونه‌ها می‌تواند یکی از گونه‌های A.castellani، A.griffini ،A.quina ،A.hatchetti ،A.rhysodes ،A.polyphaga A.divionensis ،A.triangularis ،A.lugdunensis A.paradivionensis باشد (شکل ۵).

نتایج تحقیق نشان داد که از ۴۲ نمونه آلوده به آمیب،۳۱ نمونه (۷۳/۸۱ درصد) به یک نوع آمیب و ۱۱ نمونه (۲۶/۱۹ درصد) به دو نوع آمیب آلودگی داشتند و فراوانی گونه های آکانتامبا (۳۹ مورد) نسبت به نگلریا (۱۴ مورد) بیش‌تر بود.

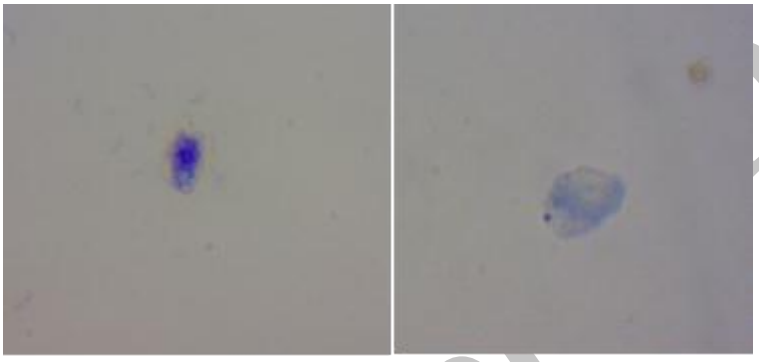


شکل ۱: فرم تاژکدار (A- 40X) و آمیبی نگلریا درون محیط کشت (B- 10X)

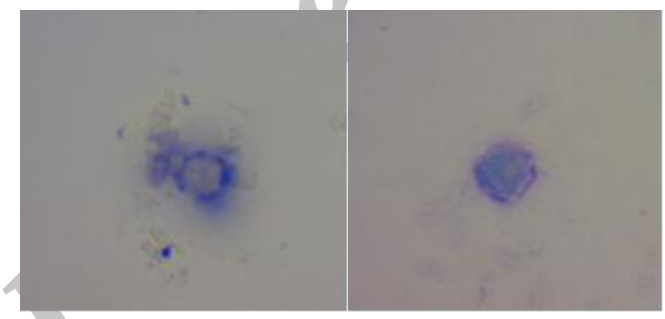
www.SID.ir
Archive of SID



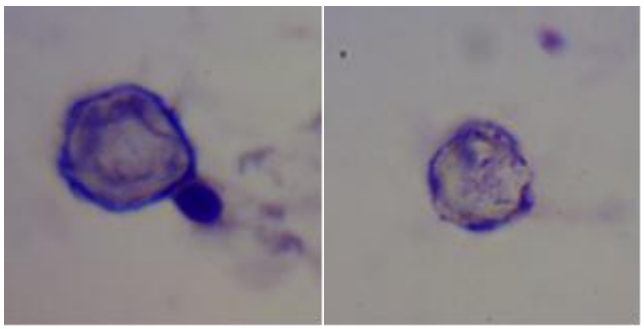
شکل ۲: فرم تروفوزوئیت و کیست آکانتامبا درون محیط کشت- 10X



شکل ۳: فرم‌های تاژکدار و آمیبی نگلریا – رنگ آمیزی گیمسا – 100X



شکل ۴: فرم کیست Acanthamoeba.asteronyxis- رنگ آمیزی گیمسا – 100X



شکل ۵: فرم کیست آکانتامبا-رنگ آمیزی گیمسا – 100X

www.SID.ir

بحث:

در تحقیق حاضر که به منظور شناسایی آمیب‌های آزادزی در منابع آب شیراز به روش کشت و بررسی میکروسکوپی بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی انجام شد، از ۱۲۰ نمونه آب بررسی‌شده، ۴۲ نمونه (۳۵ درصد) از این نظر مثبت بودند. از نمونه‌های آلوده به آمیب،۳۱ نمونه (۷۳/۸۱ درصد) به یک نوع آمیب و ۱۱ نمونه (۲۶/۱۹ درصد) به دو نوع آمیب آلودگی داشتند و فراوانی گونه-های آکانتامبا (۳۹ مورد) نسبت به نگلریا (۱۴ مورد) بیش‌تر بود. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که امکان آلودگی منابع آب چاه، مخزن، شبکه آب‌رسانی به آمیب‌های آزادزی وجود دارد و چاه‌ها از سایر منابع آلوده‌ترند (۴۴/۴ درصد).

در تحقیقی که توسط رضائیان و همکاران روی آب و خاک رودخانه‌ها و دریاچه پریشان در منطقه کازرون انجام شد، ۳۵۴ نمونه به روش کشت و میکروسکوپی بررسی شدند که آلودگی به ۱۰ مورد آکانتامبا و ۳ مورد نگلریا گزارش شد [۶]. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که درصد آلودگی به آمیب‌های آزادزی و فراوانی هر یک از آن‌ها نسبت به مطالعه حاضر کم‌تر بوده است. افتخار و همکاران نیز ۲۲ نمونه از آب‌های سطحی و میادین شهر تهران را از نظر آلودگی به آمیب‌های آزادزی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد بررسی قرار دادند و مشخص شد که ۱۳ نمونه (۵۹ درصد) از این نظر آلودگی دارند که ۶ نمونه (۲۷ درصد) آلوده به آکانتامبا بودند [۷]. در این تحقیق با وجود بالاتر بودن درصد آلودگی به آمیب‌های آزادزی، فراوانی آلودگی به آکانتامبا کم تر از تحقیق حاضر بوده است. بر اساس نتایج تحقیق باقری و همکاران در ۴۵ نمونه (۴۸ درصد) از ۹۴ نمونه آب شیر ۱۳ بیمارستان شهرهای مختلف ایران آکانتامبا یافت شد [۸]. از نظر درصد آلودگی آب آشامیدنی به آکانتامبا نتیجه این تحقیق کم‌تر از تحقیق حاضر (۷۳/۸۱ درصد) است. در پرتغال، کارلوسو و همکاران با بررسی ۱۳۵ نمونه از منابع آب، مخازن، تانکرها و بخش‌های مختلف بیمارستان‌های دولتی نشان دادند که ۴۷ نمونه (۳۵ درصد)، به آمیب‌های آزادزی آلوده‌اند [۹]. با توجه به محل نمونه‌گیری، نتایج تحقیق اخیر از نظر درصد آلودگی به آمیب‌های آزادزی با نتایج تحقیق حاضر مشابه است. در نیکارگوآ، لیوا و همکاران، ۱۱۱ حلقه چاه، ۷۴ نمونه آب شیر و ۲۱ نمونه آب مناطق گرمسیری را به منظور شناسایی آمیب‌های آزادزی به روش مولکولی مورد بررسی قرار دادند و از ۲۰۱ نمونه بررسی شده ۴۳ درصد مثبت بودند. یافته-های این تحقیق نشان داد در مناطق شهری و مناطق گرمسیری آلودگی به آکانتامبا به ترتیب ۲۱ درصد و ۲ درصد و آلودگی به نگلریا به ترتیب ۱۰ و ۱۹ درصد است [۱۰]. نتایج این تحقیق در مقایسه با تحقیق حاضر حاکی از بالاتر بودن درصد آلودگی به آمیب‌های آزادزی می‌باشد، اما درصد آلودگی به آکانتامبا و نگلریا به صورت جدا کم‌تر از تحقیق حاضر می‌باشد. در مطالعه شوف و همکاران، از ۲۸۳ نمونه آب خانگی، ۸۰ مورد آلوده به آمیب‌های آزادزی بودند و علاوه بر آکانتامبا (۲/۸ درصد)، هارتمنلا و والکامفیا نیز مشاهده شد [۱۱] ولی درصد آلودگی به آمیب‌های آزادزی و فراوانی هر یک از آن‌ها نسبت به مطالعه حاضر کم‌تر بوده است. در بررسی اداگاوا و همکاران، شیوع آمیب‌های آزادزی در آب آشامیدنی که منبع تغذیه آن آب رودخانه و تصفیه خانه آب واقع در اوزکای ژاپن بود ۶۸/۷٪ با گونه‌های آکانتامبا و نگلریا گزارش شد و بررسی مولکولی گونه A.asteronexis را نشان داد. درصد آلودگی به آمیب‌های آزادزی نسبت به مطالعه حاضر بیش‌تر بود. [۱۲]. توماس و همکاران، در بررسی تصفیه خانه های آب آشامیدنی در سوئیس مشاهده کردند که نگلریا و آکانتامبا در نمونه‌ها وجود دارد [۱۳]. نتایج دو تحقیق اخیر از نظر نوع آلودگی و وجود نگلریا و آکانتامبا با نتایج تحقیق حاضر مشابه است.

بررسی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی ۱۲۰ نمونه آب نشان داد که تقریباً همه پارامترها (کدورت، کلر باقیمانده، دما، pH، آمونیاک، نیتریت، تیترات، هدایت الکتریکی و سختی آب) با توجه به استانداردهای سازمان آبفا در محدوده طبیعی قرار دارند. بررسی دمای آب نمونه‌های آلوده به آمیب‌های آزادزی نشان داد که این آمیب‌ها در دامنه دمایی ۱۲-۲۵/۹°C قادر به رشد و حضور هستند. بررسی پارامترهای میکروبی نشان داد که از ۴۲ نمونه آب حاوی آمیب آزادزی ۲۱ نمونه (۵۰ درصد) از نظر کلیفرم کلی و ۱۳ نمونه (۳۱ درصد) از نظر کلیفرم گرماپای مثبت‌اند، اما ارتباط معناداری بین آلودگی آب به آمیب‌های آزادزی و وجود کلیفرم‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). از آن‌جایی که شمارش کلیفرم‌ها در نمونه‌های آب به روش MPN انجام می شود، منفی بودن نتیجه نمونه‌های آب به معنی عدم حضور کلیفرم‌ها نیست، بلکه به منزله کاهش تعداد کلیفرم‌ها و نرمال بودن آب از نظر شرب می‌باشد و این آمیب‌ها عمدتاً از باکتری‌ها تغذیه می‌کنند. بررسی نتایج حاصل از کلر باقیمانده در نمونه-های آب حاوی آمیب‌های آزادزی نشان داد که ۳۹ نمونه (۹۲/۸۵ درصد) فاقد کلر باقیمانده و ۳ نمونه (۷/۱۵ درصد) حاوی کلر بودند و این موضوع نشان‌دهنده تأثیر کلر بر ممانعت از رشد و تکثیر این آمیب‌ها می‌باشد. این بدان علت است که وجود کلر باقیمانده به میزان زیادی می‌تواند در پیشگیری از رشد این آمیب‌ها موثر باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

به علت این که ترفوزوئیت و کیست آمیب‌ها از نظر اندازه متغیر هستند و این موضوع تشخیص قطعی آن‌ها را به روش مورفولوژی مشکل می‌سازد، در نتیجه این روش به تنهایی قادر به تشخیص قطعی جنس و گونه‌های این آمیب‌ها نیست. از این رو برای شناسایی و تعیین گونه آمیب‌های آزادزی پیشنهاد می‌شود از روش های مولکولی از جمله واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز، PCR - RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism)، real-time PCR و تعیین توالی استفاده شود.

نتیجه‌گیری: از آن‌جایی که بیماری‌زا بودن بعضی از این آمیب‌ها از جمله Naegleria fowleri، Acanthamoeba palyphaga، A.castellani و A.astronyxis کاملاً محرز شده است و همچنین مشخص شده است که اینها می‌توانند حامل عوامل میکروبی عفونی خطرناکی باشند، ضروری است با به کارگیری روش‌های جدید ضد عفونی و تصفیه منابع آب، از آلودگی احتمالی آن‌ها با آمیب‌های آزادزی و عوامل عفونی جلوگیری کرد.

تقدیر و تشکر: نویسندگان از همکاری صمیمانه مدیریت اداره آبفا استان فارس برای جمع‌آوری نمونه‌ها و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جهرم برای انجام آزمایشات نهایت تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1. Visvesvara, GS, Schuster FL. Opportunistic free-living amoebae, part 1. Clin Microbiol News Lett 2008; 30(20): 151-158.
2. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free living amoebae: *Acanthamoeba* spp, *Balam-uthia mandrillaris*, *Naegleria fowler*i, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 50(1): 1-26.
3. John DT, Petri WA. Markell and Voge's Medical Parasitology. 9th ed. London: W. B. Saunders; 2006.
4. Szenasi Z, Endo T, Yagita K, Nagy E. Isolation, identification and increasing importance ,of 'free-living' amoebae causing human disease. Med Microbiol 1998; 47: 5-16.
5. Pagnier I, Didier R, Bernard La. Isolation and identification of amoebae-resisting bacteria. Environ Microbiol 2008; 10(5): 1135-44.
6. Rezaian M, Bagheri F, Farnia Sh, et al. Isolation of pathogenic Amoeba (Naegleria and Acanthamoeba) from water sources and margin soils of rivers and lakes in Kazerun. J School Public Health Instit Public Health Res 2002; 1(3): 41-8. (Persian)
7. Eftekhar M, Nazemalhosseini Mojarad E, Haghighi A, et al. Detection of Acanthamoeba from fresh water using polymerase chain reaction. J Shaheed Beheshti Univ Med Sci Health Serv 2009; 33(1): 43-6. (Persian)
8. Bagheri HR, Shafiei R, Shafiei F, et al. Isolation of Acanthamoeba Spp. from drinking waters in several hospitals of Iran. Iran J Parasitol 2010; 5(2): 19-25. (Persian)
9. Carlesso A, Simonetti A, Artuso G, et al. Isolation and identification of potentially pathogenic free- living amoeba in samples from environments in a public hospital in the city of Porto Alegre, Rio Grand do Sul. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40(3): 316-20. (Portuguese)
10. Leiva B, Clasdotter E, Linder E, et al. Free-living Acanthamoeba and Negleria spp. Amebae in water sources of León, Nicaragua. Int J Trop Biol 2007; 56(2): 439-46.
11. Shoff ME, Rogreson A, Kessler K, et al. Prevalence of Acanthamoeba and other naked amoebae in south Florida domestic water. J water Health. 2008; 6(1): 99-104.
12. Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, et al. Isolation and genotyping of potentially pathogenic Acanthamoeba and Naegleria species from tap-water sources in Osaka, Japan. Parasitol Res 2009; 105(4): 1109-17.
13. Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, et al. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. FEMS Microbiol Rev 2010; 34(3): 231-59.
14. Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin Microbiol Rev 2002; 15(3): 342-54.
15. Boost M, Cho P, Lai S, et al. Detection of Acanthamoeba in tap water and contact lens cases using polymerase chain reaction. Optom Vis Sci 2008; 5(7): 526-30.
16. Marciano-Cabral F, MacLean R, Mensah A, et al. Identification of Naegleria fowleri in Domestic Water Sources by Nested PCR, Appl Environ Microbiol 2003; 69(10): 5864-9.
17. Maghsood A, Rezaian M. Indentification and characterization of Acanthamoeba spp isolated from keratitis cases and environmental sources of Iran using PCR-RFLP, 18s rDNA sequencing and physiological methods. Iranian J Public Health 2005; 34(2): 40-7.
18. Magliano AC, da Silva FM, Teixeira MM, et al. 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.
19. Eaton AD, Clesceri LS, Rice EW, et al. Standard method for the examination of drinking water and waste

www.SID.ir

water. 21st ed. Baltimore: United Book Press, Inc; 2005: 9010-711.
20. Hammersmith KM. Diagnosis and management of Acanthamoeba Keratitis. Curr Opin Opthalmol 2006; 17(4): 327-31.
21. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, et.al. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. Parasitol Res 2004; 92(5): 405-13.
22. Page F. A new key to freshwater and soil gymnamoebae. 1st ed. Ambleside, UK: Freshwater Biol Assoc; 1988.
23. Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomic du genre Acanthamoeba (Protozoa, Amoebida). Protistologica 1977; 13: 557-98. (French)

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Isolation and identification of free living amoeba (Naegleria and Acanthamoeba) in Shiraz water resources by morphological criteria

Ghadar-ghadr Sh[1], Solhjoo K[*2], Norouz-nejad MJ[3], Rohi R[2], Zia-Jahromi S[4]

Received: 08/06/2011 Revised: 02/17/2012 Accepted: 04/23/2012

1. Microbiology Lab, Shiraz Water and Waste Water Bureau, Shiraz, Iran
2. Dept. of Microbiology, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
3. Dept. of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran
4. Dept. of Geology-Hydrology, Payam Nour University, Jahrom, Iran

Journal of Jahrom University of Medical Sciences, Volume 10, Number 3, Fall 2012

J Jahrom Univ Med Sci 2012; 10(3):33-41

Abstract

Introduction:
Free living amoebas are opportunistic pathogens that usually exist in different environmental conditions such as warm and polluted water, even in water supply networks and they could cause serious diseases in humans. So, due to their medical importance, identification of free living amoeba in water resources is necessary.

Materials and Methods:
Water samples were collected from 70 water wells, 30 water resources and 20 water supply networks in the first six months of 2010. Then, the samples were cultured on non-nutrient agar and the amoeba were collected and stained by Giemsa stain for morphological studies.

Results:
42 out of 120 samples (35%) contained free living amoeba. Out of them, 31 samples (73.81%) were polluted with one amoeba and 11 (26.19%) with one amoeba. The frequency of Acanthamoeba species (39 cases) was higher than that of Neagleria (14 cases) and the wells were more polluted than others (44.40%). Based on morphological characteristics, four pathogenic ameba were identified (Naegleria fowleri, Acanthamoeba polyphaga, A.castellani and A.astronyxis).

Conclusions:
The results showed that water resources contained free living amoeba and some important and pathogenic species of these amoebas were identified by morphological characteristics. Thus, it is necessary to employ new methods for disinfection and filtration of water resources so that the infection with free living amoeba and infectious agents is prevented.

Keywords: Amoeba, Acanthamoeba, Naegleria, Water Resources, Morphology

* Corresponding author, Email: solhjouk@yahoo.com

www.SID.ir