



Genotyping of Acanthamoeba Isolated from Soil in Varamin City, Iran

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Mohammadnajar M.¹ MSc,
Ghaffarifar F.*¹ PhD,
Dalimi Asl A.¹ PhD,

How to cite this article

Mohammadnajar M, Ghaffarifar F, Dalimi Asl A. Genotyping of Acanthamoeba Isolated from Soil in Varamin City, Iran. Pathobiology Research. 2020;23(1):19-25.

ABSTRACT

Aims The soil is one of the important sources of Acanthamoeba human infection. Regarding the increasing number of Acanthamoeba keratitis cases in recent years in Iran, more attention to investigating this amoeba now is made. The present study aimed to identify the genotypes of Acanthamoeba in Varamin City using polymerase chain reaction (PCR) technique.

Materials & Methods Totally, 18 samples of soil were collected from 12 parks in Varamin City. The samples were filtered using 0.45µm nitrocellulose membrane filters. Then, they were cultured in non-nutrient agar medium 1.5% enriched with killed cultured bacteria *Escherichia coli*. Genomic DNA was extracted by DNG-plus™ solution and PCR amplification was performed using specific primers to amplify a 500bp 18S rRNA. Sequencing analysis and BLAST search were done for genotype identification of positive samples.

Findings Out of 18 soil samples, 6 isolates (33.3%) were found to be positive for Acanthamoeba in medium by microscopic observation meanwhile 4 isolates (22.2%) were confirmed by Acanthamoeba genus-specific primers. Genotype identification was revealed that all samples belonged to T4 type.

Conclusion Considering this result, the soil of parks is possible be a risk factor for people, particularly children in this area. Therefore, more attention of public health authorities is recommended.

Keywords Acanthamoeba; T4 Genotype; Soil; Varamin City

CITATION LINKS

[1] Identification and distribution of Acanthamoeba species ... [2] Novel Acanthamoeba 18S rRNA ... [3] Isolation and genotyping of Acanthamoeba ... [4] Isolation and molecular characterization of ... [5] Genotyping of Acanthamoeba isolates and ... [6] Isolation and genotyping of ... [7] Pathogenesis of Acanthamoeba ... [8] Distribution of Acanthamoeba genotypes ... [9] Ophthalmology hospital wards ... [10] Isolation of Acanthamoeba ... [11] Standardized method ... [12] Characterisation and differentiation of pathogenic ... [13] Acanthamoeba castellanii: High antibody ... [14] Balamuthia and Acanthamoeba-binding antibodies in West African human ... [15] Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living ... [16] Diagnosis and management of Acanthamoeba ... [17] Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of Acanthamoeba isolates from ocular ... [18] Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and acanthamoeba ... [19] Genotyping of Acanthamoeba species isolated from keratitis patients by PCR sequencing methods in Tehran ... [20] Detection of Acanthamoeba from fresh water using polymerase chain ... [21] Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage ... [22] Current status of Acanthamoeba in Iran: a narrative review ... [23] An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and ... [24] Isolation and genotyping of Acanthamoeba ... [25] Genotyping of Acanthamoeba isolated from surface and stagnant waters of Qazvin, Central ... [26] Occurrence of Potentially Pathogenic Bacterial-Endosymbionts in Acanthamoeba ... [27] The role of domestic tap water in Acanthamoeba contamination in contact lens ... [28] Isolation of potentially pathogenic strains of Acanthamoeba in wild squirrels from the Canary Islands ... [29] Identification and quantification of the Acanthamoeba species and genotypes from reservoirs in Taiwan by ... [30] Molecular characterization of pathogenic Acanthamoeba isolated from drinking and recreational water in East ... [31] Isolation and molecular characterization of Acanthamoeba genotypes isolated from soil sources of public and recreational areas in ...

¹Department of Medical Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Department of Medical Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Postal Code:1411713116
Phone: +98 (21) 82884553
Fax: +98 (21) 82884555
ghafarif@modares.ac.ir

Article History

Received: April 30, 2019
Accepted: May 14, 2020
ePublished: June 22, 2020

تعیین ژنوتایپ گونه‌های آکانتامبا جداسازی شده از خاک شهرستان ورامین، ایران

محمد محمدنجان MSc

گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

فاطمه غفاری فر PhD

گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

عبدالحسین دلیمی اصل PhD

گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: خاک یکی از منابع مهم آلودگی انسان به آکانتامبا است. با توجه به افزایش موارد کراتیت آمیبی در سال‌های اخیر در ایران، توجه بیشتری نسبت به بررسی این آمیب در حال حاضر شده است. مطالعه حاضر با هدف جداسازی گونه‌های آکانتامبا با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و تعیین ژنوتایپ‌های آنها در شهر ورامین انجام شد.

مواد و روش‌ها: به‌طور کلی ۱۸ نمونه از ۱۲ پارک شهر ورامین جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از فیلترهای نیتروسولوز ۴۵/۴۵ میکرونی عبور داده شدند. پس از فیلترکردن نمونه‌ها، آنها روی محیط آگار غیرمغذی ۱/۵٪ همراه با باکتری *شریشیا کلی* کشته شده کشت داده شدند. DNA ژنومیک با محلول DNG- plusTM از پلیت‌های مثبت استخراج شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *18S rRNA* با تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی به روش PCR مورد شناسایی قرار گرفت. نمونه‌های مثبت برای تعیین ژنوتایپ، تعیین ترادف شدند.

یافته‌ها: از ۱۸ نمونه خاک، ۶ ایزوله (۳۳/۳٪) آکانتامبا، در محیط کشت از نظر مورفولوژی شناسایی شدند که از این تعداد ۴ ایزوله (۲۲/۲٪) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس آکانتامبا تایید شدند. ژنوتایپ تمامی نمونه‌ها T4 گزارش شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این نتیجه، خاک پارک‌ها احتمال دارد یک عامل خطر برای افراد، مخصوصاً کودکان در این منطقه باشد. از این رو، توجه بیشتری به نکات بهداشت عمومی توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آکانتامبا، ژنوتایپ T4، خاک، شهر ورامین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۵

نویسنده مسئول: ghafarif@modares.ac.ir

مقدمه

آکانتامبا (*Acanthamoeba*) یک تک‌یاخته آمفی‌ژوئیک فرصت‌طلب است که توزیع گسترده‌ای در طبیعت دارد و می‌تواند در خاک، گرد و غبار و منابع آبی یافت شود. این ارگانیزم در چرخه زندگی خود دو مرحله دارد: تروفوزوئیت فعال که قادر به تکثیر است و مرحله کیستی که در این مرحله آمیب غیرفعال است و فعالیت متابولیکی کمی را انجام می‌دهد. آمیب در فرم کیستیک خود قادر است برای سالیان متمادی زنده بماند. طی چند دهه گذشته،

آکانتامبا به‌عنوان یک ارگانیزم میکروبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شده است و امروزه این آمیب یکی از عوامل عفونت‌های جدی در انسان محسوب می‌شود. از دلایل اهمیت این آمیب می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

(۱) افزایش تعداد موارد عفونت‌های آکانتامبایی ناشی از افزایش تعداد افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی و افراد مصرف‌کننده لنزهای تماسی

(۲) نقش بالقوه این آمیب در آکوسیستم

(۳) نقش آکانتامبا به‌عنوان میزبان یا مخزن برای پاتوژن‌های میکروبی از جمله ویروس‌ها (اندوسیمیونت)

از عفونت‌های مهم این آمیب می‌توان به کراتیت آکانتامبایی که در استفاده‌کنندگان از لنزهای تماسی دیده می‌شود و می‌تواند به نابینایی منجر شود و بیماری نادر و کشنده آنسفالیت اشاره کرد. آنسفالیت ناشی از آکانتامبا به نام آنسفالیت آمیبی گرانولوماتوز (GAE) در افراد دچار نقص سیستم ایمنی، معروف است [1-4].

طبقه‌بندی این آمیب براساس مورفولوژی، تحرک و ظاهر کیست‌ها از ارزش فیلوژنتیک برخوردار نیست و در واقع این خصوصیات، تشخیصی نیستند. جدیدترین طبقه‌بندی بر مبنای مطالعات ژنومی آکانتامبا است که براساس توالی ژن *rRNA*، ۲۰ ژنوتایپ (T1-T20) برای جنس آکانتامبا تعیین شده است [3, 5-7]. طبق

مطالعات انجام‌شده، ۹۰٪ ایزوله‌های آکانتامبا که موجب بیماری می‌شوند، متعلق به ژنوتایپ T4 هستند که به‌دلیل ویرولانسی بیشتر آن است [8-10]. فاکتور اصلی در گسترش آکانتامبا در آب و خاک، وجود منبع غذایی باکتریایی است. آب‌های گرم ممکن است رشد و گسترش آکانتامبا خصوصاً سویه‌های مقاوم به دما را افزایش دهند و برخی گونه‌ها ممکن است حرارت را تحمل کنند اما بیماری‌زا نباشند. دمای قرنیه چشم انسان ۳۵-۳۲°C است. به

همین دلیل وارپته‌های وسیعی از آکانتامبا قادر به سکونت در سطح قرنیه هستند [9]. در سال‌های اخیر بروز عفونت‌های ناشی از آکانتامبا افزایش قابل توجهی نشان داده است. این پدیده عمدتاً به‌علت افزایش تعداد استفاده‌کنندگان از لنزهای تماسی، آگاهی و تشخیص بهتر است [7, 11-14]. رایج‌ترین، ارزان‌ترین و موفق‌ترین روش جداسازی آکانتامبا از نمونه‌های بیوپسی قرنیه، لنزهای

تماسی و تراشه قرنیه، کشت نمونه‌ها بر روی محیط آگار غیرمغذی ۱/۵٪ است. ابتدا به محیط، مقداری باکتری گرم منفی مانند *شریشیا کلی* برای رشد آمیب اضافه می‌شود. نمونه‌ها پس از

کشت و بعد از ۷۲ ساعت، توسط میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار می‌گیرند. میکروسکوپ کانفوکال می‌تواند یک روش مفید و غیرتهاجمی برای تشخیص باشد. PCR حساس‌تر از کشت است، بنابراین می‌تواند به‌طور ویژه در تایید تشخیص بالینی در بیمارانی که کشت منفی دارند مفید باشد [15-18]. در سال‌های اخیر استفاده از روش PCR برای شناسایی آکانتامبا در ایران افزایش یافته است. در مطالعه‌ای، به‌منظور تشخیص و شناسایی کراتیت‌های

علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انتقال یافتند.

فیلتراسیون نمونه‌ها

در این مرحله، به نمونه‌ها حدود الیتر آب مقطر اضافه شد و سپس به‌خوبی مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس حدود ۵۰۰ میلی‌لیتر از مایع روبی برای فیلتراسیون استفاده شد. فیلتراسیون با استفاده از کاغذ فیلتر واتمن ۴۲ (قطر ۵/۲ میکرون) و پمپ خلأ صورت گرفت. نهایتاً فیلترهای کاغذی به‌صورت وارونه روی محیط حاوی آگار غیرمغذی ۱/۵% (NNN) همراه با لایه‌ای از *اشریشیا کلی* کشته‌شده، کشت داده شدند. محیط‌ها در انکوباتور در دمای ۲۶°C قرار گرفتند. روز بعد به‌منظور جلوگیری از رشد ساپروفیت‌های قارچی فیلترها از روی محیط‌ها برداشته و پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت به‌صورت روزانه به‌منظور مشاهده رشد آکانتامبا در محیط کشت در زیر میکروسکوپ اینورت و نوری حاشیه محیط‌ها بررسی شدند. برای حذف آلودگی قارچی، کلونینگ آمیب از پلیت اولیه صورت گرفت. بدین ترتیب که تعداد کمی از کیست‌های آمیب از پلیت اولیه به پلیت بعدی منتقل شدند تا اینکه نهایتاً پس از پاساژهای متوالی، پلیت عاری از آلودگی به دست نیامد. بنابراین نمونه‌های حاوی کیست آکانتامبا با اسیدکلریدریک ۳% سه بار و با سرعت ۷۵۰ دور بر دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه شست‌وشو داده شدند. برای حذف اسید باید کیست‌ها با بافر فسفات‌سالین (PBS) شست‌وشو داده شوند.

برداشت آمیب از سطح پلیت به‌منظور استخراج

در این روش روی محیط حاوی آمیب، میزان ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات‌سالین و یا سرم فیزیولوژی استریل ریخته و سپس با استفاده از پیپت‌پاستور استریل سطح پلیت کاملاً با بافر مخلوط شد تا آمیب‌ها در بافر غوطه‌ور شوند. در مرحله بعد، توسط پیپت‌پاستور تروفوزوئیت و کیست‌ها به همراه بافر به میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری انتقال یافتند و پس از سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، رسوب کافی از آمیب حاصل شد. برای حذف آگارهای اضافی این عمل ۳ بار صورت گرفت. در این مرحله پس از شست‌وشوی پلیت‌ها، چند نمونه برای رنگ‌آمیزی گیمسا کنار گذاشته شدند.

آماده‌کردن نمونه‌ها برای استخراج DNA

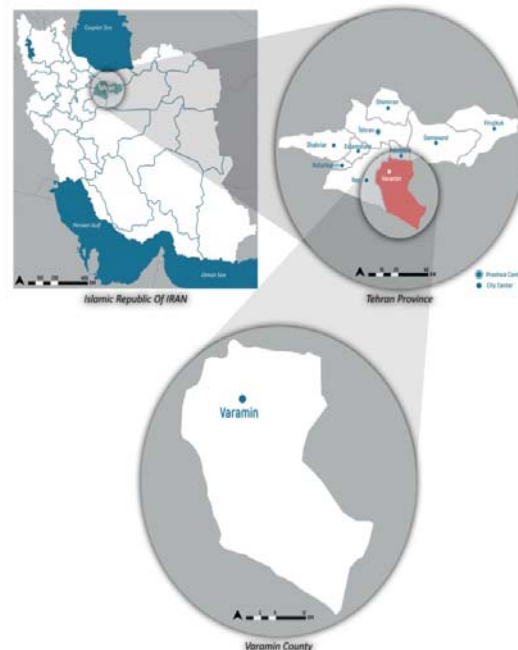
ابتدا در زیر هود و در شرایط کاملاً استریل، ۱/۵ میلی‌لیتر سالین روی پلیت‌های کشت حاوی محیط آگار غیرمغذی برداشته شد و در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع روبی دور ریخته و به رسوب PBS اضافه و دوباره ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع روبی دور ریخته و رسوب برای استخراج DNA از انگل در فریزر ۲۰°C نگهداری شد. استخراج DNA با استفاده از کیت Plus DNG™ (سینا کلون؛ ایران) انجام شد.

آکانتامبایی از روش PCR استفاده شده است [19]. در بررسی‌های انجام‌شده مشخص شد که اغلب بیماران مبتلا قبل از شروع بیماری با منابع محیطی از جمله آب و خاک ارتباط داشته‌اند. وجود آکانتامبا در خاک یکی از ریسک فاکتورهای مهم در انتقال بیماری به‌خصوص در افراد مستعد که شامل افراد مصرف‌کننده لنز تماسی، کودکان و افراد با سیستم ایمنی ناکارآمد هستند، محسوب می‌شود [20]. از آنجایی که انتقال آکانتامبا به انسان از طریق خاک می‌تواند صورت بگیرد و از طرفی تاکنون مطالعه‌ای در مورد شیوع آمیب آکانتامبا از شهرستان ورامین انجام نشده است، بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی حضور آکانتامبا در خاک شهرستان ورامین در استان تهران و تعیین ژنوتایپ‌های آکانتامبای جداسازی شده انجام شد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

ورامین یکی از شهرستان‌های استان تهران و مرکز آن شهر ورامین واقع در ۳۵ کیلومتری جنوب شرقی شهر تهران است (شکل ۱).



شکل ۱) منطقه جغرافیایی محدوده شهرستان ورامین

جمع‌آوری نمونه

مطالعه مقطعی حاضر در بازه زمانی خرداد تا شهریور ۱۳۹۵ انجام شد. در این مطالعه، اقدام به جمع‌آوری ۱۸ نمونه از خاک پارک‌های تفریحی شهرستان ورامین شد. نمونه‌برداری از عمق ۱۰ سانتی‌متری در اواخر فصل بهار و اوایل فصل تابستان که هوا گرم بود انجام شد و در مرحله بعد نمونه‌ها برای انجام آزمایشات مورد نظر به آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی دانشکده

توسط میکروسکوپ اینورت و نوری مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی اولیه بر مبنای خصوصیات کیست آمیب صورت گرفت. پس از گذشت ۳ هفته به دلیل کندرشدن استرین‌های آمیب در ۶ نمونه (۳۳/۳٪) آکانتامبا با اشکال متنوع در جدار داخلی از قبیل کروی، ستاره‌ای و چندوجهی مشاهده شدند (شکل ۲).

رنگ‌آمیزی گیمسا

در رنگ‌آمیزی گیمسا بهترین نسبت استفاده شده ۱ به ۴۰ و مناسب‌ترین زمان برای رنگ‌گرفتن کیست‌های آکانتامبا موجود در کشت حدود ۱۲ دقیقه بود (شکل ۳).

نتایج حاصل از PCR جنس آکانتامبا در نمونه‌های خاک

پس از استخراج DNA و انجام مراحل PCR، محصول PCR بر روی ژل بارگذاری شد و الکتروفورز انجام گرفت. در PCR پس از ۳۵ سیکل، قطعه‌ای حدود ۶۱۶ جفت باز تکثیر یافت. محصول PCR روی ژل ۱/۵٪ بارگذاری شد و باند مورد نظر در نور فرابنفش با استفاده از دستگاه ترانسلومیناتور مشاهده شد (شکل ۴). در هر ۴ نمونه پس از انجام مراحل PCR باندهای قوی و مشخص مشاهده شد.

پس از انجام الکتروفورز بر روی محصولات PCR، نمونه‌ها برای تعیین توالی و تخلیص باندهای مشاهده‌شده به شرکت پیشگام ارسال شدند. پس از دریافت فایل‌های مربوط به تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Sequencher 5.4.6 اقدام به استخراج اطلاعات به صورت فایل‌هایی با پسوند fasta شد تا در مرحله بعد با استفاده از ابزار جست‌وجوی هم‌ترازی پایه BLAST سایت NCBI، تعیین همولوژی داده‌های حاصل با موارد ثبت‌شده در بانک ژن صورت گیرد. پس از بلاست کردن هر یک از داده‌ها نتایج به گونه‌ای بود که در مورد آکانتامبا ۹۷ تا ۹۹/۹٪ همولوژی با موارد ثبت‌شده در بانک ژنی وجود داشت.

جدول (۲) ایزوله‌های آکانتامبای جدا شده از مکان‌های منتخب شهرستان ورامین در سال ۱۳۹۵

مکان نمونه‌گیری	تعداد نمونه‌ها	تعداد آکانتامبای ایزوله‌شده از هر پارک
پارک آزادگان	۴	۲
پارک گل‌ها	۱	صفر
پارک کارخانه قند	۱	صفر
پارک جوانان	۱	۱
پارک حافظ	۱	صفر
پارک مسافر	۲	۲
پارک شهدای ۱۵ خرداد	۲	۱
پارک میراث فرهنگی	۱	صفر
محوطه بیمارستان ۱۵ خرداد	۱	صفر
محوطه بیمارستان مفتوح	۱	صفر
محوطه دانشگاه شهید بهشتی	۱	صفر
شعبه بین‌الملل	۱	صفر
بلوار معلم	۲	صفر

واکنش PCR به منظور ردیابی آکانتامبا با استفاده از پرایمر JDP 1, 2

این پرایمرها تحت عنوان پرایمر اختصاصی جنس آکانتامبا، اولین بار توسط شرودر و همکاران در سال ۲۰۰۱ طراحی شدند. این پرایمرها محصولی با اندازه ۴۵۰-۴۵۰ جفت باز را تولید می‌کنند. پرایمرهای JDP برای شناسایی این جنس بسیار اختصاصی عمل می‌کنند [21, 22]. برنامه حرارتی PCR برای قطعه ژنی 18s rRNA در جدول ۱ ذکر شده است. پرایمرهای Forward: 5'- GGCCAGATCGTTTACCGTGAA -3' و Reverse: 5'- TCTACAAGCTGCTAGGGGAGTCA -3' از شرکت سیناکلون خریداری شدند.

محصول PCR متعاقب الکتروفورز روی ژل آگارز و با رنگ‌آمیزی با سیف‌استین (سینا کلون؛ ایران) به منظور ترکیب شدن با مولکول DNA و ایجاد فلورسانس و با استفاده از دستگاه ترانسلومیناتور UV (UVITEC؛ انگلستان) مشاهده شد و برای تخلیص و تعیین توالی به شرکت پیشگام فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Sequencher 5.4.6 و Chromas 2.6.6 به صورت Forward و Reverse و به طور کامل و دقیق با یکدیگر مقایسه و مرتب شدند. سپس توالی‌های مربوط به نمونه‌های مورد مطالعه با توالی‌های ثبت‌شده در Genbank با استفاده از برنامه Blast مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و ژنوتایپ ایزوله‌ها مشخص شد.

جدول (۱) برنامه حرارتی PCR برای قطعه ژنی 18s rRNA

تعداد سیکل	مدت زمان (دقیقه)	دما	مراحل
۱	۵	۹۵°C	دنا تراسیون اولیه
	۱	۹۵°C	دنا تراسیون
۳۵	۱	۶۰°C	اتصال (Annealing)
	۱	۷۲°C	طویل شدن
۱	۱۰	۷۲°C	طویل شدن نهایی

یافته‌ها

در این مطالعه، تعداد ۱۸ نمونه خاک از پارک‌های تفریحی شهرستان ورامین جمع‌آوری شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و با بهره‌گیری از روش‌های مورفولوژی و مولکولی، آکانتامبا در ۶ نمونه (۳۳/۳٪) ایزوله شد. در این مطالعه با استفاده از روش کشت، تکنیک PCR و تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعه‌ای از ژن 18s rRNA، آمیب آکانتامبا در ۴ ایزوله (۲۲/۲٪) از ۱۸ نمونه مثبت شناسایی شد. پس از آنالیزهای مولکولی روی ۴ نمونه آکانتامبا، ژنوتایپ‌های T4 برای آنها مشخص شد. اطلاعات توصیفی یافته‌ها در جدول ۲ خلاصه شده است.

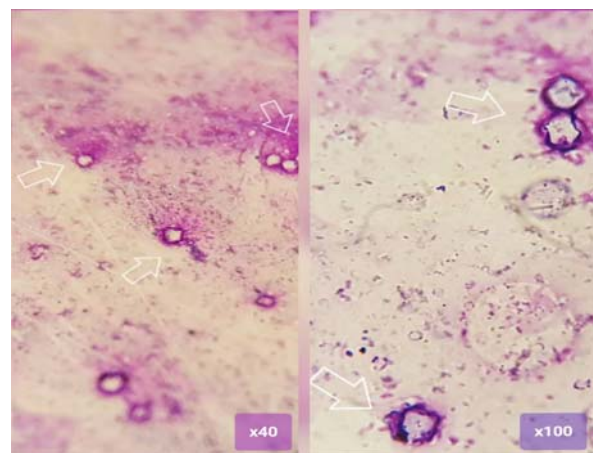
یافته‌های میکروسکوپی

پس از کشت نمونه‌های خاک روی محیط NNA، پلیت‌ها روزانه

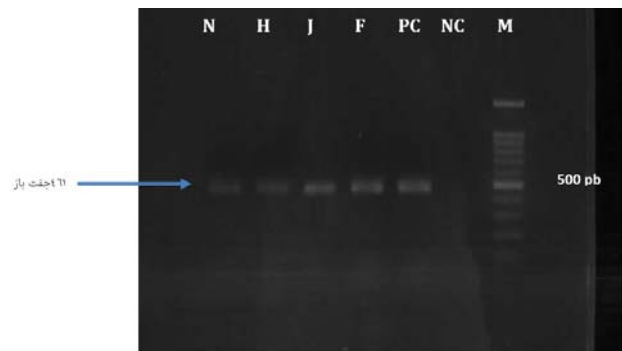
مختلف جدا شده و در ایران نیز با توجه به شیوع کراتیت آکانتامبایی دارای اهمیت است [23]. براساس نتایج این مطالعه ۶ نمونه (۳۳/۳٪) از خاک شهر ورامین در سال ۱۳۹۵ از نظر وجود آکانتامبا با روش کشت مثبت هستند. نتایج حاضر با یافته‌های نیاتی و همکاران که از ۵۲ نمونه خاک، ۱۴ ایزوله (۲۶/۹٪) آکانتامبا در محیط کشت از نظر مورفولوژی شناسایی کردند و از این تعداد ۹ ایزوله (۱۷/۳٪) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس آکانتامبا تایید شدند [24] و نیز مطالعه هوشیار و همکاران که از ۴۰ نمونه مورد بررسی به روش کشت، در ۳۲ نمونه (۸۰٪) آمیب‌های آزادی رشد و تکثیر یافتند و با استفاده از روش PCR در ۱۴ نمونه مثبت (۴۳/۸٪) آکانتامبا تشخیص داده شد [25] همخوانی دارد. در مطالعه نیاتی و همکاران از بین ۳۵ نمونه مربوط به آب استخرها، ۵ ایزوله (۱۴/۲٪) آمیب جنس آکانتامبا در محیط کشت از نظر مورفولوژی شناسایی شدند [26]. شناسایی جنس آکانتامبا تنها براساس ویژگی‌های مورفولوژی به دلیل تغییرات در شکل کیست به علت شرایط محیط کشت غیرقابل اعتماد است و طبقه‌بندی براساس ویژگی‌های مولکولی صحیح‌تر است [19, 27]. در مطالعه حاضر از روش PCR برای تایید آکانتامبا در نمونه‌های ایزوله شده از خاک استفاده شد. نتایج PCR با پرایمرهای اختصاصی آکانتامبا نشان داد که از ۶ نمونه دارای نتیجه مثبت، ۴ نمونه (۲۲/۲٪) از نظر آکانتامبا مثبت هستند. نمونه‌هایی که دارای نتیجه کشت مثبت هستند اما نتیجه PCR منفی دارند احتمالاً متعلق به سایر آمیب‌های آزادی از جمله هارتمنلا هستند. در مطالعات گذشته شیوع آکانتامبا در منابع محیطی مختلف در سرتاسر جهان مورد مطالعه قرار گرفته است. در مطالعه‌ای بر روی نمونه‌های خاک، از میان ۱۱۴ نمونه خاک، در ۴۳ مورد (۳۷/۷٪) آکانتامبا شناسایی و ژنوتایپ T4 به عنوان ژنوتایپ غالب گزارش شد [28]. در مطالعه کائو و همکاران، در تایوان ۲۱ نمونه آب جمع‌آوری و PCR انجام شد و در ۳۴ نمونه گونه‌های آکانتامبا وجود داشت که از این تعداد در ۱۹ نمونه ژنوتایپ جدا شده آکانتامبا T4 شناخته شد [29]. در ایران در مطالعه بهنیا فر و همکاران آکانتامبا در ۱۷ (۲۵/۴٪) نمونه آب جمع‌آوری شده شناسایی شد و ۵۸/۸٪ ایزوله‌ها متعلق به ژنوتایپ T4 بودند [30]. همچنین در مطالعه کرمتی و همکاران روی ۶۰ نمونه خاک، گونه‌های آکانتامبا از ۴۱/۶٪ نمونه‌ها جداسازی شدند و بیشترین ایزوله‌های جدا شده متعلق به ژنوتایپ‌های T3 و T4 بودند [31]. فراوانی ژنوتایپ T4 در نمونه‌های خاک مورد بررسی حاکی از خطر بالقوه آن در ابتلای افرادی است که در تماس با خاک و یا گرد و غبار قرار می‌گیرند. این مساله افزایش آگاهی پزشکان در خصوص اهمیت پزشکی آمیب‌های آزادی و به ویژه جنس آکانتامبا و توجه برنامه‌ریزان سلامت این منطقه در جهت اطلاع‌رسانی مناسب و برنامه‌ریزی‌های آینده برای پیشگیری و آگاهی مردم را از خطر آلوده شدن می‌طلبد.



شکل ۲) تصویر کیست‌ها (فلش‌های سفید رنگ) در پلیت کشت با عدسی 20X میکروسکوپ اینورت



شکل ۳) کیست‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ گیمسا (بزرگنمایی ۴۰x و ۱۰۰x)



شکل ۴) الکتروفورز محصول PCR تعدادی از ایزوله‌ها با استفاده از پرایمر اختصاصی جنس آکانتامبا (JDP1, 2) بر روی نمونه‌های خاک: M: مارکر وزن مولکولی (۱۰۰ جفت باز); NC: کنترل منفی; PC: کنترل مثبت; F, J, H و N: نمونه‌ها

بحث

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آکانتامبا در خاک شهر ورامین شیوع دارد و این آمیب‌های جدا شده از نوع ژنوتایپ T4 هستند. آکانتامبا یک آمیب آزادی و یکی از شایع‌ترین تک‌یاخته‌های موجود در طبیعت است. این آمیب از محیط‌های

- Acanthamoeba strains from corneal infections in Italy. J Med Microbiol. 2010;59(11):1324-30.
- 7- Panjwani N. Pathogenesis of Acanthamoeba keratitis. Ocul Surf. 2010;8(2):70-9.
- 8- Niyiyati 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.
- 9- Lasjerdi Z, Niyiyati M, Lorenzo-Morales J, Haghghi A, Taghipour N. Ophthalmology hospital wards contamination to pathogenic free living Amoebeae in Iran. Acta Parasitol. 2015;60(3):417-22.
- 10- Mohammadi Manesh R, Niyiyati M, Yousefi HA, Eskandarian AA. Isolation of Acanthamoeba spp. from different water sources in Isfahan, central Iran, 2014. J Parasit Dis. 2016;40(4):1483-6.
- 11- Chappell CL, Wright JA, Coletta M, Newsome AL. Standardized method of measuring acanthamoeba antibodies in sera from healthy human subjects. Clin Diagn Lab Immunol. 2001;8(4):724-30.
- 12- Walochnik J, Sommer K, Obwaller A, Haller-Schober EM, Aspöck H. Characterisation and differentiation of pathogenic and non-pathogenic Acanthamoeba strains by their protein and antigen profiles. Parasitol Res. 2004;92(4):289-98.
- 13- Brindley N, Matin A, Khan NA. Acanthamoeba castellanii: High antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. Exp Parasitol. 2009;121(3):254-6.
- 14- Kiderlen AF, Radam E, Schuster FL, Adjogoua EV, Akoua-Koffi C, Leendertz FH. Balamuthia and Acanthamoeba-binding antibodies in West African human sera. Exp Parasitol. 2010;126(1):28-32.
- 15- Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin Microbiol Rev. 2002;15(3):342-54.
- 16- Hammersmith KM. Diagnosis and management of Acanthamoeba keratitis. Curr Opin Ophthalmol. 2006;17(4):327-31.
- 17- Yera H, Zamfir O, Bourcier T, Ancelle T, Batellier L, Dupouy-Camet J, et al. Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of Acanthamoeba isolates from ocular infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007;26(3):221-4.
- 18- Vaddavalli PK, Garg P, Sharma S, Sangwan VS, Rao GN, Thomas R. Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and acanthamoeba keratitis. Ophthalmology. 2011;118(1):29-35.
- 19- Nayeri Chegeni T, Ghaffarifar F, Pirestani M, Dalimi Asl A, Maspi N. Genotyping of Acanthamoeba species isolated from keratitis patients by PCR sequencing methods in Tehran, Iran. Int J Med Lab. 2019;6(4):259-65.
- 20- Eftekhari M, Nazem AM, Haghghi A, Sharifi K, Nouchi Z, Athari A. Detection of Acanthamoeba from fresh water using polymerase chain reaction. J Res Med Sci. 2009;33(1):43-6. [Persian]
- 21- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, et al. Use of subgenetic 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.
- 22- Niyiyati M, Rezaeian M. Current status of Acanthamoeba in Iran: a narrative review article. Iran J Parasitol. 2015;10(2):157-63.

از نقاط قوت مطالعه حاضر این بود که این مطالعه برای اولین بار در شهر ورامین انجام شد. می توان خاک را به عنوان یکی از ریسک فاکتورهای مهم در انتقال این بیماری در نظر گرفت. در مطالعه حاضر T4 به عنوان تنها ژنوتایپ شناخته شده گزارش شد. آلودگی خاک به خصوص پارک های تفریحی که محل بازی کودکان است می تواند به عنوان یک خطر بهداشتی در سلامت کودکان محسوب شود. بنابراین نصب تابلوهای هشداردهنده در پارک ها می تواند راهکار مناسبی در جهت پیشگیری از عفونت های مرتبط با آکانتامبا باشد.

تشکر و قدردانی: مطالعه حاضر، مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی پزشکی است که اعتبار مالی آن توسط دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است. نویسندگان از اعضای محترم گروه انگل شناسی و حشره شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و زحمات آقای دکتر عبدلی و آقای دکتر بهروز مهدوی پور و خانم دکتر زهره لاسجردی نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: محمد محمدنجانار (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش شناسی/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ فاطمه غفاری فر (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۳۰٪)؛ عبدالحسین دلیمی اصل (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۳۰٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی پزشکی در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

منابع

- 1- Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelly DJ, Fuerst PA. Identification and distribution of Acanthamoeba species genotypes associated with nonkeratitis infections. J Clin Microbiol. 2005;43(4):1689-93.
- 2- Magnet A, Henriques-Gil N, Galván-Díaz AL, Izquierdo F, Fenoy S, Del Aguila C. Novel Acanthamoeba 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. Parasitol Res. 2014;113(8):2845-50.
- 3- Todd CD, Reyes-Batlle M, Martín-Navarro CM, Dorta-Gorrín A, López-Arencibia A, Martínez-Carretero E, et al. Isolation and genotyping of Acanthamoeba strains from soil sources from Jamaica, West Indies. J Eukaryot Microbiol. 2015;62(3):416-21.
- 4- Todd CD, Reyes-Batlle M, Piñero JE, Martínez-Carretero 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.
- 5- Zhao G, Sun Sh, Zhao J, Xie L. Genotyping of Acanthamoeba isolates and clinical characteristics of patients with Acanthamoeba keratitis in China. J Med Microbiol. 2010;59(4):462-6.
- 6- Gatti S, Rama P, Matuska S, Berrilli F, Cavallero A, Carletti S, et al. Isolation and genotyping of

- 28- Lorenzo-Morales J, Lopez-Darias M, Martínez-Carretero E, Valladares B. Isolation of potentially pathogenic strains of *Acanthamoeba* in wild squirrels from the Canary Islands and Morocco. *Exp Parasitol*. 2007;117(1):74-9.
- 29- 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.
- 30- Behniafar H, Niyati M, Lasjerdi Z. Molecular characterization of pathogenic *Acanthamoeba* isolated from drinking and recreational water in East Azerbaijan, Northwest Iran. *Environ Health Insights*. 2015;9:7-12.
- 31- Karamati SA, Niyati M, Lorenzo-Morales J, Lasjerdi Z. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* genotypes isolated from soil sources of public and recreational areas in Iran. *Acta Parasitol*. 2016;61(4):784-9.
- 23- Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 2015;22:10.
- 24- Niyati M, Ebrahimi M, Haghighi A, Haydari S. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from recreational soil of parks in Tehran, Iran. *ARMAGHANE DANESH*. 2013;18(7):530-8. [Persian]
- 25- Hooshyar H, Hosseinbigi B, Saraei M, Alizadeh S, Eftakhar M, Rasti S, et al. Genotyping of *Acanthamoeba* isolated from surface and stagnant waters of Qazvin, Central Iran. *Iran Red Crescent Med J*. 2013;15(6):536-8.
- 26- Niyati M, Mahyar MA, Haghighi A, Vala MH. Occurrence of Potentially Pathogenic Bacterial-Endosymbionts in *Acanthamoeba* Spp. *Iran J Parasitol*. 2015;10(2):181-8.
- 27- 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(2):47-50.