ORIGINAL ARTICLE

# *Genotyping of Acanthamoeba in Rural Drinking Water Sources in Kashan and Aran-Bidgol, Iran*

Gholamreza Mostafaei[1],
Mansooreh Sabbaghian Bidgoli[2],
Sima Rasti[3],
Sayyed Gholamabbas Moosavi[4],
Leila Iranshahi[2]

[1] Associate Professor, Department of Environmental Health, Faculty of Health, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
[2] MSc in Environmental Health, Faculty of Health, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
[3] Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
[4] MSc in Statistics, Faculty of Health, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

(Received July 15, 2018 ; Accepted September 10, 2018)

## *Abstract*

**Background and purpose:** *Acanthamoeba* spp. are an opportunistic protozoan in environmental sources that can cause respiratory infection and keratitis. The present study was conducted to determine the prevalence and genotypes of *Acanthamoeba* in rural drinking water sources in Kashan and Aran-Bidgol, Iran.

**Materials and methods:** In this study, 162 samples from 54 drinking water sources were collected in 2017. After samples filtration, they were cultured on non-nutrient agar to isolate free-living amoeba. After DNA extraction, the Polymerase Chain Reaction using JDP1, JDP2 primers was performed to detect *Acanthamoeba* spp. and finally the genotype of eight isolates was determined. Data analysis was done in SPSS applying Chi-square and Fisher's exact test.

**Results:** Among the samples 35.2% were found to be contaminated with free-living amoeba, among which 19 isolates (11.7%) were confirmed as *Acanthamoeba*. The rates of free-living amoeba and *Acanthamoba* were 35.4% and 11.8%, respectively, in Kashan, which were higher than those in Aran-Bidgol. Frequency of free-living amoeba in Qanat, well, and spring was 55.6%, 30.2%, and 26.7%, respectively. *Acanthamoeb*a contamination rates were 13.9%, 11.5% and 10%, respectively. *Acanthamoeba* contamination rate was higher in surface wells than that in deep wells. The genotype of all *Acanthamoeba* isolates belonged to T4.

**Conclusion:** This study revealed that drinking water sources were contaminated with free-living amoeba and *Acanthamoeba.* All isolates were T4 genotype, therefore, these sources could be considered as a risk factor for public health.

***Keywords:*** free-living amoeba, *Acanthamoeba*, drinking water sources

**J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28 (169): 130-139 (Persian).**

* **Corresponding Author: Sima Rasti-** Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
(E-mail: rasti_s@yahoo.com)

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18 ]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۹ بهمن سال ۱۳۹۷ (۱۳۹-۱۳۰)

# شناسایی و تعیین ژنوتایپ *آکانتامبا* در منابع آب آشامیدنی روستایی کاشان و آران بیدگل

غلامرضا مصطفایی[۱]
منصوره صباغیان بیدگلی[۲]
سیما راستی[۳]
سید غلام عباس موسوی[۴]
لیلا ایرانشاهی[۲]

## چکیده

**سابقه و هدف:** *آکانتامبا* تک یاخته فرصت طلبی که در طبیعت یافت می شود و قادر به ایجاد عفونت‌های تنفسی و کراتیت می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی آلودگی منابع آب آشامیدنی به ژنوتایپ های *آکانتامبا* در کاشان و آران-بیدگل انجام پذیرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، ۱۶۲نمونه از ۵۴ منبع آب آشامیدنی، در سال۱۳۹۶ جمع آوری و بعد از فیلتراسیون، روی آگار غیر مغذی کشت و از نظر آمیب های آزادزی بررسی گردید. پس از استخراج DNA، واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهایJDP1 وJDP2، جهت شناسایی *اکانتامبا* انجام و ژنوتایپ ۸ ایزوله *آکانتامبا* تعیین شد. داده‌ها در نرم افزار SPSS با آزمون آماری کای دو و فیشر تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** ۳۵/۲ درصد نمونه ها آلوده به آمیب های آزادزی بودند و ۱۹ مورد( ۱۱/۷درصد) *آکانتامبا* تأیید شد. میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* درکاشان بیش‌تر از آران–بیدگل و به ترتیب ۳۵/۴ درصد و ۱۱/۸ درصد بود. میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی در قنات، چاه و چشمه به ترتیب ۵۵/۶ درصد، ۳۰/۲ درصد و ۲۶/۷ درصد و آلودگی *آکانتامبا*، ۱۳/۹درصد، ۱۱/۵درصد و ۱۰ درصد تعیین شد. میزان آلودگی به *آکانتامبا* در چاه‌های سطحی بیشتر از عمیق بود. ژنوتایپ تمام ایزوله های *آکانتامبا* T4 تعیین شد.

**استنتاج:** نتایج نشان دهنده آلودگی منابع آب آشامیدنی به آمیب های آزادزی و *آکانتامبا* بود و با توجه به این که تمامی ژنوتایپ های شناسایی شده از نوع بیماری زای T4 بودند، این منابع می توانند به عنوان یک فاکتور خطر برای سلامت عمومی تلقی گردند.

**واژه های کلیدی:** آمیب های آزادزی، *آکانتامبا*، منابع آب آشامیدنی

## مقدمه

یکی از اهداف مهم جوامع بشری دستیابی به توسعه و پیشرفت در سایه تأمین آب آشامیدنی سالم است. آب آلوده عامل انتقال بسیاری از عوامل بیماری زا نظیر تک یاخته ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها به انسان می‌باشد(۱). آمیب‌های آزادزی به خصوص جنس *آکانتامبا* علت اصلی آلودگی آب آشامیدنی به شمار می‌روند که به

**مولف مسئول: سیما راستی**– کاشان: دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی E-mail: rasti_s@yahoo.com
۱. دانشیار، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۲. کارشناسی ارشد بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۳. استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۴. کارشناسی ارشد آمار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۷/۴/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۷/۵/۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۷/۶/۱۹



[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18 ]

وفور در طبیعت یافت شده و از فاضلاب، آب‌های سطحی، منابع آب شهری و روستایی، بطری‌های آب معدنی، خاک، گرد و غبار، محلول‌های شستشوی چشم و لنزهای تماسی جدا شده است(۶-۲). این تک یاخته دارای زندگی دوگانه بوده و در صورت فراهم بودن شرایط مساعد حالت انگلی پیدا می‌کند(۴). از طرفی این تک یاخته با برخی از باکتری‌ها و ویروس‌های بیماری‌زا از قبیل *لژیونلا*، *ویبریو کلرا*، *مایکوباکتریوم* و *هلیکوباکتریوم*، *آدنوویروس*، *کوکساکی ویروس* و *اکو ویروس* همزیستی داشته و تروفوزوئیت آن به عنوان مخزن این گروه از میکروارگانیزم ها شناخته شده است که سبب حفظ، تکثیر و انتقال آن‌ها می‌شود(۱۰-۷). این انگل به وسیله کیست یا تروفوزوئیت و از طریق آب، هوا، گرد و غبار و از راه بینی منتقل می‌گردد(۴). تاکنون ۲۰ ژنوتایپ *آکانتامبا* گزارش شده که اکثراً بیماریزا هستند و بیماری‌هایی از جمله آنسفالیت گرانولوماتوزی آمیبی، کراتیت *آکانتامبایی*، زخم‌های مزمن پوستی و عفونت دستگاه تنفسی فوقانی در افراد سالم و افراد دارای نقص سیستم ایمنی ایجاد می‌کند(۱۵-۱۲). آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* از منابع آب آشامیدنی ترکیه، پاکستان، تایوان، الیزابت کوئین اوگاندا و همچنین از آب‌های راکد قزوین، رودخانه‌ها و آب‌های مناطق تفریحی تهران، چشمه‌های آب گرم اردبیل، منابع آب آشامیدنی اراک، شیراز، بیرجند و آذربایجان شرقی جدا شده است(۵،۲۶-۱۶). با توجه به عدم تاثیر کلر بر روی کیست‌های آمیب و از آن‌جایی‌که آب استحصالی از منابع تأمین آب آشامیدنی، در نهایت به صورت لوله‌کشی در اختیار مصرف‌کننده قرار می‌گیرد، وجود *آکانتامبا* می‌تواند برای همه افراد خصوصاً برای افراد دارای نقص سیستم ایمنی، استفاده‌کنندگان از لنزهای تماسی، افراد مبتلا به بیماری‌های تنفسی و عفونت‌های چشمی و کودکانی که برای تفریح از این منابع استفاده می‌کنند، خطرناک باشد(۲۷). مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان آلودگی منابع آب آشامیدنی روستایی (چاه، قنات و چشمه) به آمیب آزادزی *آکانتامبا* در شهرستان‌های کاشان و آران - بیدگل، انجام پذیرفت.

## مواد و روش ها

*نمونه گیری*

در این مطالعه مقطعی، ۱۶۲ نمونه از ۵۴ منبع تأمین آب آشامیدنی در روستا های شهرستان های کاشان و آران- بیدگل به تفکیک ۶ منبع از آران-بیدگل (۶ چاه) و ۴۸ منبع از کاشان شامل (۱۰ چشمه، ۱۲ قنات و ۲۶ چاه) از فروردین تا شهریور ماه ۱۳۹۶ و طبق دستورالعمل نمونه برداری شرکت آب و فاضلاب روستایی و در ظروف ۳۰۰ میلی‌لیتری استریل شماره‌گذاری شده، جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه منتقل شد(۲۸).

*جداسازی آمیب های آزادزی*

*فیلتراسیون، کشت و پاساژ نمونه ها*

نمونه های آب با استفاده از کاغذ نیترو سلولزی ۰/۴۵ میکرون Sartorius Stedim (شرکت بیوتک آلمان) و پمپ خلأ AEI (ساخت انگلستان ) فیلتر شدند. فیلترها به طور وارونه روی محیط کشت نوترینت آگار غیر مغذی (Non- Nutrient Agar) (NNA) ۱/۵ درصد غنی شده با *اشرشیاکلی* قرار گرفته و در دمای ۲۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه انکوبه گردید(۶). از روز سوم پس از کشت، پلیت‌ها از نظر وجود تروفوزوئیت یا کیست آمیب با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرارگرفتند. به علت دیر رشد بودن بعضی از سویه‌ها، پلیت ها حداکثر تا یک ماه نگهداری و در صورت عدم مشاهده آمیب، منفی در نظر گرفته شدند. به‌منظور به دست آوردن کشت خالص *آکانتامبا*، پلیت‌های حاوی اشکال کیستی پاساژ داده شدند و پس از سه بار شستشو، با سرم فیزیولوژی استریل و با دور ۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل به میکروتیوب‌های ۱/۵ میکرو لیتری استریل منتقل و در دمای ۲۰- درجه

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18 ]

سانتی‌گراد جهت استخراج DNA نگهداری شد. برای شناسایی آمیب از نظر مورفولوژی، یک قطره از رسوب با میکروسکوب نوری با بزرگنمایی ۴۰X، مورد بررسی قرار گرفت و با مشاهده تروفوزوئیت با پاهای کاذب سوزنی شکل و کیست با اندازه های ۲۰-۱۵ میکرو متر با دیواره چروکیده و یا ستاره ای شکل، *آکانتامبا* شناسایی شد(۵،۴).

*استخراج DNA*

استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری DynaBio™ (تکاپوزیست ایران) و طبق دستوالعمل مربوط به آن، بر روی رسوب ۵۷ نمونه مثبت آمیب آزادزی صورت گرفت. غلظت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانو دراپ و در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد.

*تشخیص آکانتامبا با PCR*

شناسایی و تأیید *آکانتامبا* از سایر آمیب‌های آزادزی با استفاده از تکنیک PCR، پرایمرهای اختصاصی جنس *آکانتامبا* (JDP1 و JDP2) و مسترمیکس (تکاپوزیست ایران) انجام گرفت. این پرایمرها قادر به تکثیر قطعه‌ای از ژن 18S rRNA جنس *آکانتامبا* هستند(۲۲،۶). ترادف زوج پرایمرها جهت تکثیر ژنوم *آکانتامبا* در زیر آمده است.

Forward-JDP1: (5-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA)
Reverse-JDP2:(5-TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA)

واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) در حجم‌های ۲۰ میکرو لیتر و با دستگاه ترموسایکلر (Flex Cycler, Germany) به صورت، دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۳ سیکل در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، دمای آنیلینگ ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام پذیرفت. جهت بررسی نتایج PCR و اطمینان از تکثیر قطعه ژن مورد نظر، محصول PCR در کنار مارکر وزنی ۱۰۰bp روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، الکتروفورز گردید. با مشاهده باند ۴۹۰bp در زیر دستگاه UV Transluminator، نمونه مثبت در نظر گرفته شد. PCR نمونه‌ها در کنار کنترل مثبت (نمونه استاندارد *آکانتامبا* تهیه شده از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران) و کنترل منفی (آب دیونیزه به جای DNA) انجام گرفت.

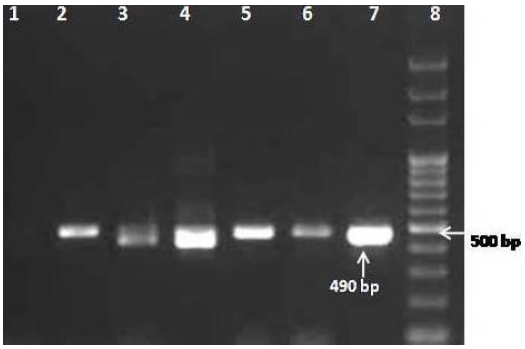
*تعیین توالی نوکلئوتیدهای محصول PCR (Sequencing)*

محصول PCR حاصل از تکثیر ژن 18SrRNA، ۸ ایزوله *آکانتامبای* جدا شده از منابع تأمین آب آشامیدنی، به شرکت تکاپو زیست (کره جنوبی)، ارسال و توالی نوکلئوتید آن‌ها تعیین گردید. پس از بلاست کردن آن‌ها در سایت NCBI و مقایسه با سایر ایزوله‌های جهان، ژنوتایپ های *آکانتامبا* شناسایی شد. داده‌ها در نرم‌افزار SPSS ثبت و با آزمون‌های آماری کای دو و فیشر تجزیه و تحلیل شدند و در $p \leq ۰/۰۵$، تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی گردید.

## یافته ها

در مطالعه حاضر، ۱۶۲ نمونه از منابع آب آشامیدنی روستاهای شهرستان‌های کاشان و آران- بیدگل، به تفکیک ۱۴۴ نمونه از شهرستان کاشان و ۱۸ نمونه از شهرستان آران- بیدگل جمع‌آوری گردید. از ۱۶۲ نمونه مورد بررسی، ۵۷ نمونه (۳۵/۲ درصد) از نظر آمیب های آزادزی مثبت بودند که با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس *آکانتامبا*، در ۱۹ ایزوله (۱۱/۷ درصد) باند حدود ۴۹۰ bp مشاهده و *آکانتامبا* تأیید شد (تصویر شماره ۱).

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18 ]




**تصویر شماره ۱:** الکتروفورز محصول PCR *آکانتامبا* با استفاده از پرایمر های JDP1 و JDP2 بر روی ژل ۱/۵ درصد

در تصویر شماره ۱، ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲ کنترل مثبت *آکانتامبا*، ستون ۳ نمونه مثبت *آکانتامبا* در قنات، ستون ۴ نمونه مثبت در چشمه و ستون های ۵ و۶ و ۷ نمونه های مثبت در چاه و ستون ۸ مارکر وزنی bp ۱۰۰ می باشد. توزیع فراوانی آلودگی منابع آب آشامیدنی به آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* در شهرستان‌های کاشان و آران-بیدگل در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

**جدول شماره ۱:** توزیع فراوانی آلودگی منابع آب آشامیدنی به آمیب های آزادزی و *آکانتامبا* در کاشان و آران- بیدگل

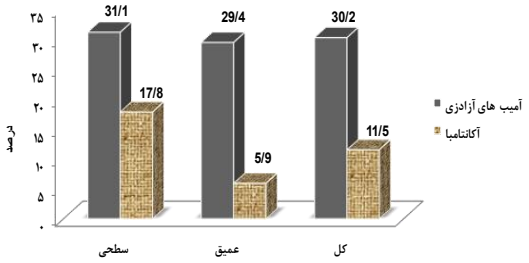
| شهرستان | آمیب های آزادزی | | *آکانتامبا* | | جمع |
|---|---|---|---|---|---|
| | مثبت | منفی | مثبت | منفی | |
| کاشان | (۳۵/۴)۵۱ | (۶۴/۶)۹۳ | (۱۱/۸)۱۷ | (۸۸/۲)۱۲۷ | (۸۸/۹)۱۴۴ |
| آران – بیدگل | (۳۳/۳)۶ | (۶۶/۷)۱۲ | (۱۱/۱)۲ | (۸۸/۹)۱۶ | (۱۱/۱)۱۸ |
| جمع | (۳۵/۲)۵۷ | (۶۴/۸)۱۰۵ | (۱۱/۷)۱۹ | (۸۸/۳)۱۴۳ | (۱۰۰)۱۶۲ |
| P.value | ۰/۸۶ | | ۱ | | |
| CI | ۰/۲۷۸۵–۰/۴۲۵۵ | | ۰/۰۶۷۵–۰/۱۶۶۵ | | |

میزان آلودگی آب به آمیب‌های آزادزی در قنات، چاه و چشمه به ترتیب ۵۵/۶ درصد، ۳۰/۲ درصد و ۲۶/۷ درصد (p = ۰/۰۱۴) و میزان آلودگی به *آکانتامبا*، ۱۳/۹ درصد، ۱۱/۵ درصد و ۱۰ درصد (p = ۰/۸۸) تعیین گردید (جدول شماره ۲).

میزان آلودگی به آمیب های آزادزی و *آکانتامبا* در آب چاه‌های سطحی به ترتیب ۳۱/۱ درصد و ۱۷/۸ درصد و در چاه‌های عمیق به ترتیب ۲۹/۴ درصد و ۵/۹ درصد بوده است (نمودار شماره ۱).

**جدول شماره ۲:** توزیع فراوانی آلودگی منابع آب آشامیدنی به آمیب های آزادزی بر حسب نوع منبع

| نوع منبع آب آشامیدنی | تعداد کل نمونه | آمیب های آزادزی | | *آکانتامبا* | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | مثبت | منفی | مثبت | منفی |
| قنات | ۳۶ | (۵۵/۶)۲۰ | (۴۴/۴)۱۶ | (۱۳/۹) ۵ | (۸۶/۱) ۳۱ |
| چاه | ۹۶ | (۳۰/۲)۲۹ | (۶۹/۸) ۶۷ | (۱۱/۵)۱۱ | (۸۸/۵) ۸۵ |
| چشمه | ۳۰ | (۲۶/۷)۸ | (۷۳/۳) ۲۲ | (۱۰) ۳ | (۹۰) ۲۷ |
| جمع | ۱۶۲ | (۳۵/۲)۵۷ | (۶۴/۸)۱۰۵ | (۱۱/۷)۱۹ | (۸۸/۳)۱۴۳ |
| P.value | | ۰/۰۱۴ | | ۰/۸۸ | |




**نمودار شماره ۱:** فراوانی آلودگی چاه های آب آشامیدنی به آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* بر حسب عمق چاه

از ۱۹ ایزوله *آکانتامبا*، توالی نوکلئوتید ۸ ایزوله تعیین گردید و ژنوتایپ آن‌ها شناسایی شد. نتایج نشان داد ژنوتایپ تمام ایزوله‌ها، T4 و میزان تشابه آن‌ها با ایزوله‌های بانک ژن ۱۰۰–۹۸ درصد بوده است. ایزوله‌ها با جزییات کامل در بانک ژن ثبت گردید. شماره‌های ثبت ژن در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

**جدول شماره ۳:** شماره ثبت ژن ها در بانک ژن

| منبع آب آشامیدنی | ژنوتایپ | شماره ثبت |
|---|---|---|
| چشمه | T4 | LC373012.1 |
| چاه | T4 | LC373013.1 |
| چشمه | T4 | LC374214.1 |
| چاه | T4 | LC373015.1 |
| چاه | T4 | LC373014.1 |
| چاه | T4 | LC374217.1 |
| چاه | T4 | LC374215.1 |
| قنات | T4 | LC374216.1 |

## بحث

در مطالعه حاضر میزان آلودگی منابع آب آشامیدنی به آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* با روش‌های کشت و PCR در روستاهای شهرستان‌های کاشان و آران-بیدگل مورد بررسی قرار گرفت. میزان آلودگی به آمیب‌های

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18 ]

آزادزی۳۵/۲ درصد (CI = ۰/۲۷۸۵-۰/۴۲۵۵) و *آکانتامبا* ۱۱/۷ درصد (CI = ۰/۰۶۷۵-۰/۱۶۶۵) بوده است.

در مطالعه قدر قدر و همکاران (۲۰۱۲ ) روی منابع آب آشامیدنی شیراز و مطالعه نیتی و همکاران روی منابع آب کیش (۲۰۱۵) میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی به ترتیب ۳۵ درصد و ۳۸/۲ درصد گزارش شده است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشته است. همچنین میزان آلودگی به *آکانتامبا* ۳۲/۵ درصد و ۲۹/۱ تایید شد که از نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بیشتر بوده است(۲۹،۲۴).

در مطالعه گلستانی و همکاران (۲۰۱۸) بر روی آب میادین و پارک‌های کاشان و مطالعه فرجی و همکاران (۲۰۱۶) روی آب استخرها و حوضچه‌های میادین خرم آباد میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی به ترتیب ۸۵/۷ درصد و ۵۹/۵ درصد و میزان آلودگی به *آکانتامبا* به ترتیب ۵۹/۴ درصد و۴۱/۷ درصدگزارش شده است که نسبت به بررسی حاضر بیش‌تر بوده است که می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع منابع مورد بررسی و تماس بیش‌تر آن‌ها با آلودگی‌های محیطی و گرد و غبار در این دو مطالعه می‌باشد(۳۱،۳۰).

در مطالعه Montalbano Di Filippo و همکاران (۲۰۱۵) روی آب لوله‌کشی در ایتالیا و مطالعه Coskun وهمکاران (۲۰۱۳) روی آب لوله‌کشی در سیواس ترکیه میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی به ترتیب ۱۷/۸ درصد و ۲۲ درصد و میزان آلودگی به *آکانتامبا* در این مطالعات به ترتیب ۴/۸ درصد و ۵/۳ درصد گزارش گردید که نسبت به مطالعه کنونی آلودگی کم‌تری نشان دادند(۳۲،۱۶). علت این تفاوت، استفاده از آب لوله‌کشی و عدم ورود آلودگی‌های محیطی به آب در این دو مطالعه می‌باشد. در بررسی حاضر میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* در منابع آب آشامیدنی روستاهای شهرستان کاشان و آران بیدگل تقریباً مشابه بود و تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد (p= ۰/۸۶). این تشابه می‌تواند به دلیل همجواری و داشتن موقعیت جغرافیایی و شرایط آب و هوایی مشابه در این دو شهرستان باشد.

در مطالعه حاضر میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی در قنات، چاه و چشمه از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است (p=۰/۰۱۴) و بیش‌ترین میزان آلودگی در قنات (۵۵/۶ درصد) مشاهده شد. از نظر میزان آلودگی به *آکانتامبا* در این منابع تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p=۰/۸۸). قنات‌ها به علت سطحی بودن و داشتن راه‌های تماس بیش‌تر با محیط و منابع خاکی همچنین دسترسی کشاورزان و دامداران به آن‌ها دارای آلودگی بیش‌تری نسبت به سایر منابع می باشند.

در مطالعه مسیبی و همکاران (۲۰۱۴) روی منابع آب روستایی اراک میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی ۶۱/۱ درصد و میزان آلودگی به *آکانتامبا* در آب قنات، چشمه و چاه به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۸۰ درصد و ۶۶/۶ درصد گزارش شد که از نتایج مطالعه حاضر بیشتر بود. احتمالاً علت این تفاوت، استفاده از روش مورفولوژیکی در تشخیص آکانتامبا در مطالعه فوق می باشد که از دقت کم‌تری نسبت به روش مولکولی برخوردار است. همچنین بیشترین میزان آلودگی در آب قنات مشاهده شد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشته است(۵). در مطالعه قدر قدر (۲۰۱۲) روی منابع آب شیراز، چاه‌ها به عنوان آلوده‌ترین منابع به *آکانتامبا* (۴۴/۴ درصد) شناسایی شدند که با مطالعه حاضر همخوانی نداشته است(۲۴).

در مطالعه ای که بهنیافر و همکاران (۲۰۱۵) روی منابع آبی (چشمه‌های آب سرد و گرم، چاه‌های خانگی، رود خانه و آب لولهکشی) در آذربایجان شرقی انجام دادند، میزان آلودگی به *آکانتامبا* با دو روش کشت و PCR، ۲۵/۴ درصد گزارش شد. همچنین میزان آلودگی به *آکانتامبا* در چشمه های آب سرد، آب لوله‌کشی و چاه‌ها به ترتیب ۱۷/۲ درصد، ۳۷/۵ درصد و ۳۳/۳ درصد گزارش شد که نسبت به نتایج مطالعه حاضر بیشتر بوده است(۲۶). براساس نتایج مطالعه خضری و همکاران (۲۰۱۶) بر روی منابع آبی مختلف (زرینه رود، سیمینه

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18 ]

رود و آب لوله کشی) در شمال غربی ایران، میزان آلودگی به *آکانتامبا* در آب رودخانه ۴۵ درصد و در آب لوله‌کشی آلودگی مشاهده نشد(۳۳).

در مطالعه Leiva و همکاران (۲۰۰۸) روی منابع مختلف آب نیکاراگوئه، میزان شیوع آمیب‌های آزادزی در آب چاه‌ها و چشمه‌ها به ترتیب ۵۷ و ۷۵ درصد و میزان شیوع *آکانتامبا* ۱۹ و ۲۱ درصد بود که نسبت به مطالعه حاضر بیشتر بوده است(۳۴). در مطالعه Kuk و همکاران (۲۰۱۳) روی آب چاه‌ها در کایسری ترکیه میزان آلودگی به *آکانتامبا* با دو روش کشت و PCR، ۱۹/۲ درصد گزارش شد که نسبت به مطالعه کنونی آلودگی بیش‌تری نشان داد(۳۵).

در مطالعه حاضر میزان آلودگی به آمیب های آزادزی و *آکانتامبا* در چاه‌های سطحی بیش‌تر از عمیق بوده است، اما تفاوت آن از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (به ترتیب P=۰/۸۵۶ و p=۰/۰۶۸). چاه های سطحی به دلیل قطر زیاد دهانه آن ها (حداقل ۱ متر و ۲۰ سانتی‌متر) به علت حفاری دستی و احتمال انتقال خاک و آلودگی در اثر طوفان، رفت و آمد، بازدید و تعمیرات، آلودگی بیشتری نسبت به چاه‌های عمیق دارند. تاکنون ۲۰ ژنوتایپ مختلف *آکانتامبا* (T1-T20) شناسایی گردید و اغلب ژنوتایپ‌های *آکانتامبای* جدا شده از محیط و نمونه‌های کلینیکی، T4 و از نظر مرفولوژیکی در گروه دوم (II) قرار دارند. ژنوتایپ‌های T4، T3 و T5 علاوه بر شیوع بیش‌تر، نقش مهم‌تری در بروز بیماری‌ها ایفا می‌کنند(۲، ۱۱، ۳۱).

در مطالعه حاضر نیز ژنوتایپ ۸ ایزوله *آکانتامبا*، T4 بود. بهنیافر (۲۰۱۵) در آذربایجان شرقی T3، T4، T5 و T13، گلستانی (۲۰۱۸) در کاشان ژنوتایپ‌های T2، T4، T5، T7 و T11، فرجی (۲۰۱۷) در خرم آباد T4، خضری (۲۰۱۶) در شمال غرب ایران T4 و T5، Magnet (۲۰۱۳) در اسپانیا Sent T4 (۲۰۱۶) در اوگاندا T1، T2، T4، T5، T6 و T11 و Kao (۲۰۱۵) در تایوان ژنوتایپ‌های T2 و T4 را در منابع آبی مختلف و غمی‌لویی (۲۰۱۴) ژنوتایپ T4 را از زخم‌های چشمی بیماران در بیمارستان فارابی تهران شناسایی کردند که در همه این مطالعات ژنوتایپ T4 به عنوان ژنوتایپ غالب گزارش شده است که با مطالعه حاضر مطابقت داشت(۱۸،۱۹،۲۶،۳۰،۳۱،۳۳،۳۶،۳۷). بر اساس نتایج مطالعه حاضر، میزان آلودگی به *آکانتامبا* در منابع آب شرب روستاهای شهرستان‌های آران- بیدگل نسبت به بسیاری از مطالعات مشابه در ایران، کمتر بود اما از آن‌جا که ژنوتایپ *آکانتامبا* در این مطالعه از نوع T4 بوده است و با توجه به بیماری‌زا بودن این ژنوتایپ و به خصوص نقش آن در بروز کراتیت آمیبی و آنسفالیت گرانولوماتوزی آمیبی، منابع آلوده می‌توانند به عنوان یک خطر بالقوه برای ایجاد این گونه از بیماری‌ها محسوب گردد، از این رو بهسازی منابع، حفظ میزان کلر باقیمانده مناسب در مخازن و شبکه های توزیع آب آشامیدنی و آموزش بهداشت جهت کنترل و پیشگیری از آلودگی پیشنهاد می‌گردد.

## سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان به خاطر حمایت (طرح پژوهشی ۹۶۴۴، کد اخلاق مقاله: IR.kaums.NUHEPM.REC.1396.1 و تاریخ کمیته اخلاق:) 22.3.1396 و از همکاری مسئولین محترم گروه انگل شناسی و گروه بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کاشان قدردانی می‌گردد.

## References

1. Ghaderpoori M, Dehghani MH, Fazlzadeh M, Zarei A. Survey of microbialality of drinking water in rural areas of Saqqez, Iran. Am-Euras J Agric Environ Sci 2009; 5(5): 627-632.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18 ]

2. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp, Balamuthia mandrillaris, Naeglearia fowleri and Sappinia diploidea .FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 50(1): 1-26.
3. Teixeira LH, Rocha S, Pinto RM, Caseiro MM, Costa SO. Prevalence of Potentially free living amoeba from Acantamoeba and Naegleria genera in nonhospital, public .internal environment from the city of Santos, Brazil. Braz J Infect Dis 2009; 13(6): 295-297.
4. Edrisiyan G, Rezaeian M, Mohebali M, Keshavarz H. Medical Protozoology. 1st ed. Tehran: University of Medical Sciences; 2008 (Persian).
5. Mosayebi M, Ghorbanzadeh B, Eslamirad Z, Ejtehadifar M, Rastad B. The Isolation and Detection of Acanthamoeba in Rural Water Sources of Arak, Iran. Med Lab J (MLJ) 2014; 7(4): 66-71 (Persian).
6. Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Mohebali M, Maghsood AH, et al. Genotyping of Acanthamoeba isolates from clinical and environmental specimens in Iran. Exp Parasitol 2009; 121(3): 242-245.
7. Rezaian M, Hooshyar H. A Review of Medical important of free living-amoebas. J Med Council I.R. Iran 2011; 29(1): 69-83 (Persian).
8. 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.
9. Thomas V, Loret JF, Jousset M, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a drinking water treatment plant . Environ Microbiol 2008; 10(10): 2728-2745.
10. Khan NA. pathogenesis of Acanthamoeba infections. Microb Pathog 2003; 34(6): 277-285.
11. Behera HS, Panda A, Satpathy G, Bandivadekar P, Vanathi M, Agarwal T, et al. Genotyping of Acanthamoeba spp. And characterization of the prevalent T4 type along with T10 and unassigned genotypes from amoebic keratitis patients in India. J Med Microbiol 2016; 65(5): 370-376.
12. Marciano-Cabral F, Cabral G. Acanthamoeba spp .as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev 2003; 16(2): 273-307.
13. Rezaeiaan M, FarniaSh, Niyyati M, Rahimi F. Amoebic keratitis in Iran (1997-2007). Iran J Parasitol 2007; 2(3): 1-6.
14. Rasti S, Hooshyar H, Arbabi M .Text Book of Medical Parasitology. Morsal Poblication; 2017. (Persian)
15. Fuerst PA, Booton GC, Crary M. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18SrRNA gene typing system of Acanthamoeba. J Eukaryot Microbiol 2015; 62(1): 69-84.
16. Coskun KA, Ozcelik S, Tutar L, Elaldi N, Tutar Y. Isolation and Identification of Free Living Amoebae form Tap water in Sivas, Turkey. Biomed Res Int 2013; 2013: 675145.
17. Yousuf FA, Sddiqui R, Subhani F, Khan NA. Status of free living amoebae (Acanthamoeba spp, Naegleria fowlleri, Balamuthia mandrillaris) in drinking water supplies in Karachi, Pakistan. J Water Health 2013; 11(2): 373-375.
18. Kao PM, Hsu BM, Hsu TK, Liu JH, Chang HY, JI WT. Seasonal distribution of potentially pathogenic Acanthamoeba species from drinking water reservoirs in Taiwan. Environ Sci Pollut Res Int 2015; 22(5): 3766-3773.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18 ]

19. Sente C, Erume J, Naigaga I, Kimuda Magambo Ph, Mulindva J, chvo S, et al. Prevalence of pathogenic free-living amoeba and other protozoa in natural and communal piped tap water from Queen Elizabeth protected area, Uganda. Parasit Vect 2016; 9: 1-8.
20. Hooshyar H , Hosseinbigi B , Saraei M , Alizadeh S , Eftekhar 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): 536–538.
21. Nazar M, Haghighian A, Niyyati M, Eftekhar M, Tahvildar-Biderouni F, Taghipour N, et al. Genotyping of Acanthamoeba isolated from water in recreational areas of Tehran, Iran. J Water Health 2011; 9(3): 603-608.
22. Niyyati M, Lasjerdi Z, Nazar M, Haghighi A, Nazemalhosseini Mojarad E. Screening of recreational areas of rivers for potentially pathogenic free-living amoebae in the suburbs of Tehran, Iran. J Water Health 2012; 10(1): 140-146.
23. Niyyati M, Babaei Z, Amini H, Badirzadeh H, Badirzadeh A, Rezaeian M. Isolation of Free-Living Amoebae from Sarein Hot Springs in Ardebil Province, Iran. Iran J Parasitol 2011; 6(2): 1-8.
24. Ghadar-ghadr Sh, Solhjoo K, Norouz nejad MJ. Isolation and identification of free living amoeba (Nagleria and Acanthamoeb) in Shiraz water resources by morphological criteria. J Jahrom Univ Med Sci 2012; 10(3): 33-41 (Persian).
25. Behravan M, Malekaneh M, Mesbahzadeh M, Sharifzadeh G, Namaei MH, Behnia Far H, et al. Microscopic Isolation and Characterization of Free Living Amoebae from Surface in Birjand , the Capital city of the South Khorasan. J of Birjand Univ Med Sci 2015; 22(2): 161-168 (Persian).
26. Behniafar H, Niyyati 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.
27. Bergmanson JP, Wang E, Gire AL, Osato MS. In vitro effects of medium tonicity, nutrient concentration, and free chlorine content on Acanthamoeba. Cont Lens Anterior Eye 2011; 34(4): 164-168.
28. Instructions for microbiological sampling, National Water and Waste Water Enginearing Company. Water and Waste Water Company of Isfahan province. Document Code: L-W-507-503 (Persian).
29. Niyyati M, Lasjerdi Z, Jacob L. Detection and Molecular Characterization of Potentially Pathogenic Free-living Amoebae from Water Sources in Kish Island, Southern Iran. SAGA J 2015; 8(Suppl1): 1-6.
30. Golestani MH, Rasti S, Hooshyar H, Delavari M, Mousavi SGA, et al. Molecular Identification and Genotyping of Acanthamoeba Isolated from Environmental Sources in Kashan, Central Iran. Jundishapur J Microbiol 2018; 11(4): e55582.
31. Faraji M, Maghsood AH, Fallahi Sh, Chegeni A, Karimi A, Lasjerdi Z, Fallah M. Frequency and Genotyping of Acanthamoeba Species in the Swimming Pools and Ponds of Khoramabad, Iran, in 2016. Sci J Hamadan Univ Med Sci 2017; 24(3): 236-243 (Persian).
32. Montalbano Di Filippo M, Santoro M, Lovreglio P, Monno R, Capolongo C, Calia C, et al. Isolation and Molecular Characterization of Free-Living Amoebae from Different

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18 ]

Water Sources in Italy. Int J Environ Res Public Health 2015; 12(4): 3417-3427.

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. Leiva B, Clasdotter E, Linder E, Winiecka-Krusnell J. Free-living Acanthamoeba and Naegleria spp. Amebae in water sources of León, Nicaragua. Rev Biol Trop 2008; 56(2): 439-446.
35. Kuk S, Yazar S, Dogan S, Çetinkaya Ü, Sakalar Ç. Molecular characterization of Acanthamoeba isolated from Kayseri well water. Turk J Med Sci 2013; 43(1): 12-17.
36. Magnet A , Fenoy S, Galván AL, Izquierdo F, Rueda C, Fernandez Vadillo C, et al. A yearlong study of the presence of free living amoeba in Spain. Water Res 2013; 7(19): 6966-6972.
37. Ghamilouie MM, Valadkhani Z, Rahimi F, Khoshzaban F, Aghighi Z, Hassan N. Isolation and Genotyping of Acanthamoeba Strains from Corneal Scraps. Iran J Opthalm (IrJO) 2014; 26 (2): 97-101.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18 ]