**مقاله پژوهشی**

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۸، شماره ۷، آبان۱۳۹۲(شماره پی در پی۷۹)

# جداسازی و تعیین ژنوتیپ‌های آکانتامباهای جدا شده از خاک پارک‌های تفریحی سال ۱۳۹۰تهران- ایران

**مریم ابراهیمی، مریم نیتی*، علی حقیقی، سودابه حیدری**

[۱] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۱۳

## چکیده

**زمینه و هدف**: آکانتامبا، از فراوان‌ترین آمیب‌های فرصت طلب در طبیعت است و موجب دو بیماری مهم آنسفالیت و کراتیت می‌شود. انتقال به انسان از طریق تماس با خاک و گرد و غبار و از راه تنفس و خراش‌های پوستی صورت می‌گیرد. این پژوهش با هدف جداسازی گونه‌های آکانتامبا با استفاده از روش مورفولوژیکی و مولکولی و تعیین ژنوتیپ‌های آنها در خاک پارک‌های شهر تهران انجام شد.

**روش بررسی**: در این مطالعه تجربی ۵۲ نمونه خاک، از ۱۷ پارک تهران جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از صافی عبور داده شد و بر روی محیط حاوی آگار غیر مغذی ۱/۵ درصد کشت داده شدند. استخراج DNA ژنومیک از پلیت‌های مثبت انجام گرفت و واکنش PCR جهت تکثیر ژن صورت گرفت. نمونه‌های مثبت جهت تعیین ژنوتیپ و ایزوله، تعیین ترادف شدند.

**یافته‌ها**: از ۵۲ نمونه خاک، ۱٤ ایزوله(۲٦/۹ درصد) آکانتامبا، در محیط کشت از نظر مورفولوژی شناسایی شدند، که از این تعداد، ۹ ایزوله(۱۷/۳ درصد) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس آکانتامبا تأیید شدند. ژنوتیپ تمامی نمونه‌ها T4 گزارش شد. ژنوتیپ T4 جزو استرین‌های پاتوژن انسانی می‌باشند.

**نتیجه‌گیری**: از آنجا که در تحقیق حاضر T4 به عنوان تنها ژنوتیپ شناخته شده گزارش شد و با توجه به اینکه این ژنوتیپ از اصلی‌ترین عوامل ایجاد کراتیت آمیبی مطرح شده است، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد، آلودگی خاک به خصوص خاک پارک‌ها که محل بازی و تجمع کودکان است می‌تواند به عنوان یک خطر بهداشتی در سلامت کودکان که بیشتر در معرض آن هستند، باشد.

**واژه‌های کلیدی**: آکانتامابا، ژنوتیپ، خاک، پارک

***نویسنده مسئول**: **دکتر مریم نیتی**، تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی
**Email:** maryamniyati@yahoo.com

**مقدمه**

اعضای جنس آکانتامبا از جمله فراوان‌ترین آمیب‌های فرصت طلب موجود در طبیعت هستند. ژنوتیپ‌های آکانتامبا در سراسر جهان در آب شیرین، آب دریا، استخرهای شنا، دستگاه تهویه هوا، یونیت دیالیز بیمارستان، لنزهای تماسی و غیره یافت می‌شوند(۱). آکانتامبا به دو شکل ترفوزوئیت و کیست مشاهده می‌گردد. اندازه ترفوزوئیت‌ها ۴۵-۲۰ میکرون و بسته به گونه تا ۵۰ میکرون نیز متغیر است. اندازه کیست‌ها ۲۰- ۱۳ میکرون است و دارای جدار دو لایه هستند. لایه داخلی کیست(اندوکیست) ممکن است به شکل‌های ستاره‌ای، گرد، بیضی و یا چند گوشه مشاهده شود. انتقال آکانتامبا به انسان به وسیله کیست‌ها صورت می‌گیرد. کیست‌ها همراه آب، خاک، گرد و غبار از خارج بدن و یا از یک کانون اولیه در ریه، بینی و حتی زخم‌های پوستی می‌توانند به بافت‌های بدن وارد شده و ایجاد بیماری کنند(۲). تاکنون ۱۷ ژنوتیپ مختلف آکانتامبا (T17- T1) شناسایی شده است. از ژنوتیپ‌های پاتوژن می‌توان به ژنوتیپ‌های T5, T4, T3 اشاره داشت(۳). اغلب ژنوتیپ‌های جدا شده از نمونه‌های کلینیکی از نظر ژنوتیپ در گروه T4 قرار دارند(۴). آکانتامبا موجب دو بیماری مهم می‌شود که از آن جمله آنسفالیت گرانولوماتوز آمیبی است که منحصراً در افراد دچار نقص سیستم ایمنی از جمله کودکان، افراد مبتلا به ایدز، لوکمی‌ها و افراد دریافت کننده پیوند دیده می‌شود. آنسفالیت آمیبی گرانولوماتوزی (GAE) معمولاً با نارسایی‌های عصبی کانونی و نشانه‌های افزایش فشار داخل جمجمه‌ای تظاهر می‌یابد(۵). پیش‌آگاهی GAE ضعیف است و بیماری در اکثر موارد، پس از مرگ بیمار تشخیص داده می‌شود(۶). از دیگر بیماری مهم ایجاد شده به وسیله این انگل می‌توان به کراتیت آکانتامبایی دردناک اشاره کرد، که منجر به کوری می‌شود. کراتیت آکانتامبایی معمولاً افراد با ایمنی کارآمد را گرفتار می‌کند(۳). در صورت عدم درمان کراتیت آکانتامبایی منجر به اولسر و سوراخ شدن استروما، کاهش بینایی و نهایتاً کوری می‌شود. مطالعات نشان داده است که کیست‌های آکانتامبا معلق در هوا، خاک و آب استخر از منابع خطربرای این بیماری محسوب می‌شود(۴).

همان‌طور که گفته شد، آکانتامبا در محیط‌های گوناگون محیطی وجود دارد. بنابراین انسان غالباً با این انگل برخورد می‌کند. هم‌چنان که نتایج مطالعه‌ای در آمریکا نشان داد که بیش از ۸۰ درصد از جوامع انسانی در آمریکا دارای آنتی‌بادی علیه آکانتامبا می‌باشند(۷). نتایج مطالعه‌ای که به وسیله نیتی و همکاران(۲۰۱۲) بر روی ۵۵ نمونه آب از ۱۰ رودخانه تفریحی اطراف تهران(ایران) از نظر آلودگی به آمیب‌های آزادزی انجام گرفت، نشان داد ۲۷/۳ درصد از این آب‌ها آلوده به آمیب‌های آزادزی است، که از این تعداد ۸۰ درصد این آلودگی آکانتامبا تشخیص داده شد(۸). هم‌چنین نتایج مطالعه بر روی ۱۳ نمونه گرد و غبار در ایران، برای اولین بار در دنیا نشان داد که تمامی ژنوتیپ‌های جدا شده در این منابع از عوامل

کراتیت آمیبی محسوب می‌گردند (۹). همین طور در مطالعه‌ای که بر روی منابع محیطی از جمله آب و گرد و غبار تهران از نظر آلودگی به استرین‌های پاتوژن آکانتامبا انجام شد آلودگی تمامی نمونه‌ها به این انگل را تأیید کرد(۱۰). کلیک و همکاران(۲۰۰۴)، جهت مطالعه بر روی پراکندگی محیطی آکانتامبا در ترکیه، ۲۸ نمونه خاک و ۲ نمونه آب را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق، ۱۸ نمونه از نظر آکانتامبا مثبت شدند(۱۱).

وجود آکانتامبا در منابع خاکی یکی از ریسک فاکتورهای مهم در انتقال بیماری به خصوص در افراد مستعد که شامل افراد مصرف کننده لنز تماسی و افراد با نقص سیستم ایمنی هستند تلقی می‌گردد. در این میان کودکان به علت سطح ایمنی پایین‌تر مستعد ابتلا به عفونت‌های آکانتامبایی می‌باشند. از آنجا که انتقال آکانتامبا به انسان از طریق تماس با خاک و گرد و غبار از خارج بدن و از طریق سیستم تنفسی و حتی خراش‌های پوستی می‌تواند صورت گیرد(۱۲ و ۳)، بنابراین آلودگی خاک به خصوص خاک پارک‌ها که محل بازی و تجمع کودکان است می‌تواند به عنوان یک خطر بهداشتی در سلامت کودکان که بیشتر در معرض این منابع هستند باشد. به هر حال با توجه به مطالب فوق به نظر می‌رسد مطالعات و تحقیقات بیشتری که به آشکار شدن خصوصیات ویرولانس و مارکرهای ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف این انگل به خصوص در منابع محیطی مختلف می‌انجامد، لازم و ضروری است(۴ و ۲).

**روش بررسی**

این مطالعه تجربی در زمستان سال ۱۳۹۰ انجام شد. در این مطالعه ۵۲ نمونه خاک، از ۱۷ پارک شهر تهران(ناحیه شمال، جنوب، شرق و غرب) جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در داخل ظروف حاوی آب قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها از صافی‌های نیترات سلولز(قطر منافذ ۱ میکرون) به آرامی عبور داده شدند و نهایتاً فیلترهای کاغذی بر روی محیط حاوی آگار غیر مغذی ۱/۵ درصد همراه با لایه‌ای از اشرشیا کولی کشته شده، کشت داده شد. محیط‌های کشت در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس به صورت روزانه جهت مشاهده رشد آکانتامبا در محیط کشت، در زیر میکروسکوپ نوری حاشیه فیلترها بررسی شد. به علت ماهیت دیر رشد بودن برخی استرین‌های آکانتامبا، پلیت‌ها به مدت یک ماه بررسی شدند. به منظور به دست آوردن کشت خالص آکانتامبا از آنها کلون تهیه شد. به این منظور، پلیت‌های حاوی آکانتامبا به زیر میکروسکوپ اینورت انتقال داده شد و در کنار شعله به کمک آنس استریل چند کیست از آمیب، به محیط کشت دیگر انتقال داده شد. این کار، تا به دست آوردن یک پلیت خالص‌تر از نظر آمیب مورد نظر ادامه داده شد(۴). سپس در پلیت‌های حاوی کیست آمیب، به دلیل دو جداره بودن دیواره کیست آکانتامبا، از روش فنل کلروفرم جهت استخراج DNA استفاده گردید. جهت ردیابی آکانتامبای موجود در محیط کشت، از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصیJDP استفاده شد. توالی

اولیگونوکلئوتیدی پرایمرهای JDP در این تحقیق شامل ´۳-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-´۵ و ´۳-TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA-´۵ بود. این پرایمرها از اختصاصیت بالایی در شناسایی تمامی ژنوتیپ‌های شناخته شده آکانتامبا (T1-T17) برخوردار هستند و قادرند قسمتی از ژن 18S rRNA را که حاوی نواحی متمایز کننده ژنوتیپ‌های مختلف آکانتامبا است، تقویت کنند و انتظار می‌رود که قطعه‌ای به اندازه ۵۵۱-۴۲۳ جفت باز تکثیر شود(۱۳). جهت ردیابی محصول PCR از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. نمونه‌های مثبت در واکنش PCR، جهت تعیین ژنوتیپ و ایزوله تعیین ترادف شدند. در مرحله بعد توالی نوکلئوتیدی تمامی نمونه‌های مثبت با استفاده از برنامه کروماس، ویرایش شدند و در برنامه بلاست سایت پاب مد آنالیز شدند. جنس و نوع ژنوتیپ ایزوله‌ها از ژن‌های ویرایش شده بر اساس بالاترین هومولوژی با ژن‌های موجود در بانک اطلاعات ژن تعیین شدند(۱۳ و ۴).

**یافته‌ها**

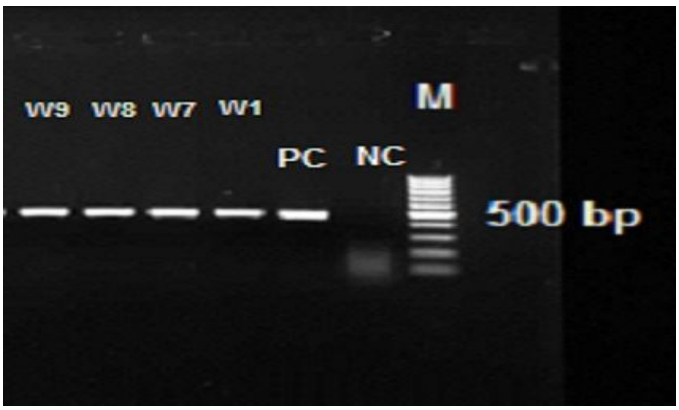
از ۵۲ نمونه خاک، ۱۴ ایزوله(۲۶/۹ درصد) آمیب آکانتامبا، در محیط کشت از نظر مورفولوژی شناسایی شدند. کلید تشخیصی آکانتامبا بر اساس خصوصیات مورفولوژیک شامل شکل و اندازه کیست و تروفوزوئیت، دو جداره بودن کیست، شکل اندوسیست و اکتوسیست انجام شد. تروفوزوئیت‌های آکانتامبا با مسطح بودن و وجود یک هسته با کاریوزوم درشت همراه با وجود آکانتاپودیاها و پاهای کاذب خار مانند و کیست‌ها بر اساس اشکال متنوع اندوکیست که می‌تواند به اشکال چند ضلعی، بیضوی، یا کروی نمایان شود، تشخیص داده شدند(تصویر۱).

از۱۴ ایزوله مثبت، ۹ ایزوله(۱۷/۱۵ درصد) آکانتامبا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس آکانتامبا تأیید شدند. با توجه به این‌که در پنج نمونه تعداد کیست‌ها کم بود و این پنج ایزوله از رشد پایین‌تری در محیط کشت برخوردار بودند، از ۱۴ ایزوله، تعیین توالی نوکلئوتیدی ۹ (۱۷/۳درصد) استرین با موفقیت انجام شد و باندی در حدود ۵۰۰-۴۵۰ جفت باز را نمایش دادند(تصویر۲).

از ۱۴ نمونه مثبت از نظر مورفولوژی ۵ نمونه متعلق به خاک پارک‌های منطقه غرب تهران، ۳ نمونه متعلق به شرق تهران، ۴ نمونه متعلق به جنوب تهران و ۲ نمونه متعلق به منطقه شمال تهران بود.

ژنوتیپ‌های آکانتامباهای ایزوله شده از ۴ منطقه پارک‌های شهر تهران در جدول ۱ نشان داده شده است. ژنوتیپ تمامی نمونه‌ها T4 گزارش شد. ژنوتیپ T4 جز استرین‌های پاتوژن انسانی هستند. علاوه بر این، تعداد ۱۷ پلیت، محتوی کیست‌های گرد و کوچکی بودند که از لحاظ مشخصات مورفولوژیکی شباهت زیادی به جنس هارتمنلا داشتند. کیست‌های هارتمنلا دارای دو جداره صاف و کروی بودند و اندازه کوچک‌تر از آکانتامبا را به خود اختصاص می‌دادند، هم‌چنین تروفوزوئیت‌های این آمیب کرمی شکل، کشیده و کوچک بودند.

**تصویر۱: کیست‌های چند ضلعی آکانتامبا جدا شده ازخاک یکی از پارک‌های مورد مطالعه در شهر تهران با استفاده از محیط آگار غیر مغذی (میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی× ۴۰۰)**




**تصویر۲: الکتروفورز محصول PCR تعدادی از ایزوله های آکانتامبا با استفاده از پرایمر اختصاصی جنس آکانتامبا، جدا شده از خاک پارک های تفریحی تهران**(M: مارکر، PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی، W1: پارک غرب(ملا صدرا)، W7: پارک غرب (کاج)، W8: سپارک غرب(باهنر)، W9: پارک غرب(شهرک غرب))

**جدول۱: ژنوتیپ‌های آکانتامباهای ایزوله شده از ۴ منطقه پارک های شهر تهران طی سال های۱۳۹۱-۱۳۹۰**

| ردیف | کد نمونه | منبع | کشت | PCR | ژنوتیپ |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | نمونه پارک غرب ۱ | پارک ملاصدرا | + | + | T4 |
| ۲ | نمونه پارک غرب ۷ | بوستان کاج | + | + | T4 |
| ۳ | نمونه پارک غرب ۸ | پارک باهنر | + | + | T4 |
| ۴ | نمونه پارک غرب ۹ | پارک شهرک غرب | + | + | T4 |
| ۵ | نمونه پارگ غرب ۱۱ | پارک ساحل | + | – | –* |
| ۶ | نمونه پارک شرق ۳ | پارک شقایق | + | + | T4 |
| ۷ | نمونه پارک شرق ۷ | پارک صبا | + | - | – |
| ۸ | نمونه پارک شرق ۶ | پارک شهید محلاتی | + | + | T4 |
| ۹ | نمونه پارک شمال ۱ | پارک سید جمال الدین | + | - | – |
| ۱۰ | نمونه پارک شمال ۳ | پارک ملت | + | + | T4 |
| ۱۱ | نمونه پارک جنوب ۲ | پارک کودک | + | - | – |
| ۱۲ | نمونه پارک جنوب ۴ | پارک لاله | + | + | T4 |
| ۱۳ | نمونه پارک جنوب ۵ | پارک دانشجو | + | + | T4 |
| ۱۴ | نمونه پاارک جنوب ۶ | پارک شهر | + | – | – |

* به دلیل آلودگی قارچی و باکتریایی در پلیت امکان استخراج ژنوم میسر نشد.

**بحث**

درصد بالای آکانتامبا در منابع خاکی در پارک‌ها نشان دهنده خطر بهداشتی آلودگی به این انگل برای سلامت عمومی به خصوص در افراد استفاده کننده از لنز تماسی، کودکان و بیماران دارای نقص ایمنی می‌باشد(۱۴). در واقع، کودکان با توجه به این‌که از نظر بهداشتی در سطح پایین‌تری هستند و همچنین وجود خراش‌های جلدی و تماس با خاک آلوده، در آنها محتمل است، لذا آلودگی خاک پارک‌ها می‌تواند آنها را مستعد ابتلا به عفونت‌های آکانتامبایی نماید. نتایج به دست آمده از مطالعات نشان می‌دهد که درصد آکانتامبا در گرد و غبار بالا است و این می‌تواند نشان دهنده خطر بهداشتی در افرادی که بیشتر در معرض این منابع هستند، باشد(۱۵و۱٤). تا آنجا که گزارش‌های نگران کننده‌ای مبنی بر وقوع کراتیت آمیبی بعد از در معرض قرار گرفتن با آلودگی گرد و غبار وجود دارد(۱۶و۱۵). لذا این پژوهش با هدف جداسازی آکانتامبا با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی در خاک پارک‌های ۴ ناحیه مختلف شهر تهران صورت گرفت. به علاوه تعیین ژنوتیپ‌های آکانتامبا با استفاده از تعیین توالی ناحیه تشخیصی ژن[1] 18s rRNA و آنالیز همولوژی ژن‌های مذکور با برنامه بلاست[2] انجام شد.

در مطالعه حاضر، نمونه خاک پارک‌های تهران در چهار منطقه شمال، جنوب، شرق و غرب، از نظر وجود آکانتامبا مورد بررسی قرار گرفت که ۹ ایزوله آکانتامبا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به جنس آکانتامبا تأیید شدند و تعیین توالی نوکلئوتیدی ۹ استرین با موفقیت انجام شد. ژنوتیپ تمامی نمونه‌ها T4 گزارش شد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که بیشترین آلودگی مربوط به خاک پارک‌های منطقه غرب و کمترین آلودگی مربوط به خاک پارک‌های منطقه شمال تهران می‌باشد. در مطالعه‌ای که به وسیله لورنزو و همکاران(۲۰۰۷) بر روی نمونه‌های خاک انجام شد، از میان ۱۱۴ نمونه خاک، در ۴۳ نمونه(۳۷/۷ درصد) آکانتامبا شناسایی شد. لازم به ذکر است که از میان ۴۳ استرین آکانتامبا، در ۳۹ مورد(۹۰/۶ درصد)، مقاومت آمیب به حرارت و اسمولاریته مشاهده شده بود که همین موضوع نمایانگر توان بالقوه پاتوژنیک بودن استرین‌های موجود در خاک است و در آن ژنوتیپ T4 به عنوان ژنوتیپ غالب گزارش شد(۱۴). رضائیان و همکاران(۲۰۰۷ ) در تهران با تحقیق بر روی ۸۰ نمونه از منابع محیطی مختلف، ۳۷ ایزوله (۴۶/۲۵ درصد) آمیب آکانتامبا را شناسایی کردند. در این پژوهش تمامی ۵ نمونه خاک مورد بررسی از نظر آلودگی به آمیب آکانتامبا مثبت تشخیص داده شدند. همچنین از ۶۱ نمونه جمع‌آوری شده از گرد و غبار محیطی، ۲۸ ایزوله(۴۵/۹ درصد) از نظر آکانتامبا مثبت تشخیص داده شد(۱۰). نیتی و همکاران(۲۰۰۸)، مطالعه‌ای را جهت تعیین ژنوتیپ ۱۰ ایزوله آکانتامبا شامل ۷ نمونه خاک، ۱ نمونه آب استخر و ۲ نمونه مدفوع گاو انجام

1-18S Ribosomal Ribo Nucleic Acid
2-Basic Local Alignment Search Tool

دادند که ژنوتیپ T4 برای نمونه‌های خاک و مدفوع و ژنوتیپ مخلوط T2 وT6 برای نمونه آب مشخص گردید(۱۷). در مطالعه دیگری که به وسیله نیتی و همکاران(۲۰۱۲) بر روی ۵۵ نمونه آب از ۱۰ رودخانه تفریحی اطراف تهران(ایران) از نظر آلودگی به آمیب‌های آزادزی انجام گرفت، نشان داد ۲۷/۳ درصد از این آب‌ها آلوده به آمیب‌های آزادزی است که ۸۰ درصد این آلودگی آکانتامبا تشخیص داده شد(۸).

ژنوتیپ پاتوژن T4، به طور وسیع در محیط وجود دارد و منابع محیطی مختلف(گرد و غبار، خاک، آب و مدفوع حیوانات) به عنوان مخزن و منبع ژنوتیپ T4 برای میزبانان حساس از جمله مصرف کنندگان لنزهای تماسی، کودکان و افراد دارای نقص سیستم ایمنی به شمار می‌روند. غالب بودن ژنوتیپ T4 به عنوان عامل کراتیت‌های آمیبی می‌تواند مربوط به بالاتر بودن پاتوژنیسیتی این ژنوتیپ(خصوصیات ویرولانس)، افزایش قابلیت انتقالی این ژنوتیپ(پراکندگی وسیع آن در مناطقی که احتمال آلودگی با کیست به وسیله انسان زیاد است) یا ترکیبی از این دو نکته باشد. نهایتاً می‌توان به این نتیجه رسید که فراوانی ایزوله T4 در کراتیت آمیبی می‌تواند مربوط به توانایی بیشتر این ژنوتیپ در اتصال به لنز تماسی و مقاومت آن به ضد عفونی کننده‌ها باشد. بنابراین تحقیقات بیشتر که به آشکار شدن خصوصیات ویرولانس و مارکرهای ژنتیکی ژنوتیپ‌های به خصوص می‌انجامد، لازم و ضروری به نظر می‌آید(۱۸ و۴).

## نتیجه‌گیری

تشخیص آکانتامبای پاتوژن متعلق به ژنوتیپ T4 در پارک‌های تفریحی از اهمیت زیادی برخوردار است. از آنجا که در تحقیق حاضر T4 به عنوان تنها ژنوتیپ شناخته شده گزارش شد و با توجه به این‌که این ژنوتیپ از اصلی‌ترین عوامل ایجاد کراتیت آمیبی، آنسفالیت‌های مغزی و عفونت‌های پوستی مطرح شده است، بنابراین خاک را به عنوان یکی از ریسک فاکتورهای مهم در انتقال این بیماری می‌توان تلقی کرد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد، آلودگی خاک به خصوص خاک پارک‌های تفریحی که محل بازی و تجمع کودکان است می‌تواند به عنوان یک خطر بهداشتی در سلامت کودکان که بیشتر در معرض آن هستند باشد. لذا باید هشدارهای لازم به مسئولین بهداشتی از نظر نصب علایم هشدار دهنده داده شود تا از بروز عفونت‌های آکانتامبایی پیشگیری شود.

## تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر در قالب پژوهش دانشجویی کارشناسی ارشد در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران انجام شد. نگارندگان مقاله از زحمات خانم زهره لاسجردی و آقای رحمت سلگی سپاسگزاری می‌نمایند.

## REFERENCES:

1.De Jonckheere JF. Molecular identification of free-living amoebae of the Vahlkampfiidae and Acanthamoebidae isolated in Arizona (USA). Eur J Protistol 2007; 43(1): 9-15.

2.Hooshyar H, Rezaian M. Amoebas: Tehran university of medical sciences research deputy; 2011.

3.Khan NA. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev 2006; 30(4): 564-95.

4.Rezaeian M, Niyyati M. Pathogenic Free Living Amebas In Human: Tehran University of Medical Sciences; 2008.

5.Shirwadkar CG, Samant R, Sankhe M, Deshpande R, Yagi S, Schuster FL, et al. Acanthamoeba encephalitis in patient with systemic lupus, India. Emerg Infect Dis 2006; 12(6): 984-6.

6.Khan NA. Emerging protozoan pathogens. 1th ed. UK: School of biological and chemical sciences Birkbeck College University of London; 2008; 20.

7.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.

8.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): 140-6.

9.Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Rahimi F, Motevalli-Haghi A, Martin-Navarro CM, Farnia S, et al. Isolation and genotyping of potentially pathogenic Acanthamoeba strains from dust sources in Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg 2009; 103(4): 425-7.

10.Rezaeian M, Niyyati M, Farnia Sh, Motevalli Haghi A. Isolation of Acanthamoeba Spp. from Different Environmental Sources. Iranian J Publhealth 2008; 12: 44-7.

11.Kilic A, Tanyuksel M, Sissons J, Jayasekera S, Khan NA. Isolation of Acanthamoeba isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. Acta Parasitol 2004; 49(3): 246-52.

12.Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. Parasit Vectors. 2012; 5: 6.

13.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.

14.Lorenzo-Morales J, Lopez-Darias M, Martinez-Carretero E, Valladares B. Isolation of potentially pathogenic strains of Acanthamoeba in wild squirrels from Canary Islands and Morocco. Experimental Parasitol 2007; 117: 74-9.

15.Ibrahim YW, Boase DL ،Cree IA. Factors affecting the epidemiology of Acanthamoeba keratitis.

Ophthalmic Epidemiol 2007; 14(2): 53-60.

16.Kamel AG, Faridah H, Yusof S, Norazah A, Nakisah MA. A case of trauma related Acanthamoeba keratitis. Trop Biomed 2004; 21(2): 35-9.

17.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): 242-5.

18.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(8): 755-9.

**Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)**

**Original Article**

# Isolation and genotyping of *Acanthamoeba spp.* from recreational soil of parks in Tehran, Iran

**Ebrahimi M, Niyyati M [*], Haghighi A, Haydari S**

Department of Medical Parasitology and Mycology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 16 Dec 2012 Accepted: 04 March 2013

## Abstract

**Background & aim:** Acanthamoeba is a genus of free-living amoebae found in environmental sources. These amphizoic amoebae can lead to severe human disease such as encephalitis and keratitis. Acanthamoeba transmits to humans through contact with soil and dust from scratching the skin. The aim of the present study was to identify the genotypes of Acanthamoeba in parks of the city of Tehran using molecular and morphological - based methods.

**Methods:** In this study, 52 samples of soil were collected from 17 parks in Tehran. Samples were then filtered and cultured on 1.5% non-nutrient agar. DNA extraction and PCR amplification was performed using genus specific primers. Sequencing analysis and BLAST search were done for genotype identification.

**Results:** Out of 52 soil samples, 14 strain (26.9%) were positive for Acanthamoeba amoebae by microscopic observation. Out Of 14 positive isolates, 9 (17.3%) were positive for Acanthamoeba using genus specific primer pairs. Of 14 strains, 9 were sequenced successfully. Genotype identification was revealed that all strains were belonged to T4 type. T4 genotypes among strains are human pathogens.

**Conclusions:** Identification of pathogenic *Acanthamoeba* belonging to T4 genotype in recreational parks could be of utmost importance. Results of this study show that soil contamination, particularly in parks where children play and assemble is a sanitary risk for them.

**Key words:** *Acanthamoeba*, Genotypes, Soil, Park

---

[*]**Corresponding Author: Niyyati M,** Department of Medical Parasitology and Mycology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
**Email: maryamniyati@yahoo.com**