DOI: 10.48305/jims.v41.i746.1075

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۴۶/هفته‌ی دوم بهمن ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۷/۱ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۶ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۱۱/۱۴

جداسازی و شناسایی آکانتامبا و نگلریا از آب شرب قزوین، ایران

پوریا فتح‌اله زاده[۱]، عیسی رضا زارع[۱]، محمد علی حسینی[۲]، امیر جوادی[۳]، پیمان حیدریان[۴]، الهام حاجی علیلو[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آمیب‌های آزادزی، تک یاخته‌های بسیار شایعی هستند، که دارای زندگی دوگانه یا آمفی زوئیک بوده و قادرند ضمن زندگی آزاد به طور اتفاقی انسان را نیز آلوده نمایند. آلودگی منابع آبی به ویژه آب شرب با آمیب‌ها می‌تواند تهدیدی برای سلامتی افراد باشد و با شناسایی آمیب می‌توان به پیشگیری و کنترل بیماری کمک شایانی کرد. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی آکانتامبا و نگلریا از آب شرب قزوین با استفاده از روش‌های مورفولوژی و مولکولی بود.

روش‌ها: در این مطالعه، ۱۲۰ نمونه آب شرب، گرم و سرد از نقاط مختلف قزوین جمع‌آوری شد. نمونه‌های به دست آمده، کشت داده شدند. جهت تشخیص گونه نمونه‌های جدا شده از روش PCR استفاده شد. تست اسمو و ترموتولرنس، جهت بررسی پاتوژنیسیتی ایزوله‌ها انجام شد و معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج آنالیز مورفولوژی و مولکولی نشان داد، که (۲۲/۵ درصد) ۲۷ از ایزوله‌ها آلوده به آمیب‌های آزادزی هستند. در بین ایزوله‌های مثبت ۱۶/۷ و ۵/۸۴ درصد از نمونه‌ها به ترتیب آکانتامبا و نگلریا شناسایی شد. آزمون آماری، اختلاف معنی‌داری بین نسبت آلودگی دو آمیب در آب شرب را نشان داد. نتایج تست پاتوژنیسیته نشان داد، که ۵۵ درصد از ایزوله‌های آکانتامبا پاتوژن هستند.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر توصیه کرد که برای سلامت عمومی به تصفیه‌ی مناسب آب آشامیدنی توجه بیشتری شود.

واژگان کلیدی: آکانتامبا؛ نگلریا؛ آب شرب؛ قزوین؛ ایران

ارجاع: فتح‌اله زاده پوریا، عیسی رضا زارع، حسینی محمد علی، جوادی امیر، حیدریان پیمان، حاجی علیلو الهام. **جداسازی و شناسایی آکانتامبا و نگلریا از آب شرب قزوین، ایران.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۴۶): ۱۰۸۱-۱۰۷۵

مقدمه

آمیب‌های آزادزی، تک یاخته‌های بسیار شایعی هستند، که در انواع محیط‌ها از جمله آب‌های شور و شیرین، آب استخر، آب شرب، فاضلاب‌ها، آب‌های راکد، آب برکه‌ها، منابع خاک و هوا، کانال‌های تهویه، آب دریاها، بطری آب، خاک و گرد و غبار یافت می‌شوند (۱-۳). آمیب‌های آزادزی دارای زندگی دوگانه یا آمفی‌زوئیک بوده و قادرند ضمن زندگی آزاد به طور اتفاقی انسان را نیز آلوده نمایند. در میان جنس‌های زیادی از آمیب‌های آزادزی که در طبیعت وجود دارند، جنس‌های آکانتامبا (*Acanthamoeba*)، بالاموثیا (*Balamuthia*)، نگلریا (*Naegleria*)، ساپینیا (*Sappinia*) و ورمابا (*Vermamoeba*) با عفونت‌های انسانی مرتبط هستند (۲، ٤-٦). مهم‌ترین بیماری‌زایی آمیب‌های آزادزی به صورت آنسفالیت آمیبی است، که توسط گونه‌های آکانتامبا، نگلریا و بالاموثیا و همچنین کراتیت آمیبی توسط گونه‌های آکانتامبا و ورمابا ایجاد می‌شود (٤، ٥، ٧-٩). انتقال آکانتامبا به انسان معمولاً از طریق کیست‌ها صورت می‌گیرد، کیست‌ها از طریق پوست آسیب دیده، تنفس و مجرای تنفسی، دستگاه گردش خون و یا استفاده از لنزهای تماسی به انسان منتقل می‌شوند (٤). نگلریا، در هنگام شنا و از طریق بینی وارد بدن انسان می‌شود و بیشتر در افرادی که سابقه‌ی شنا در آب دریاچه‌ها و برکه‌ها را دارند مشاهده می‌شود (۱۰). از آن‌جایی‌که آمیب‌های آزادزی بویژه آکانتامبا وفور زیادی در

۱- دانشجوی پزشکی، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۲- پزشک، مرکز تحقیقات سلامت مردان و بهداشت باروری، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۴- دانشیار، بخش انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۵- دانشیار، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: الهام حاجی علیلو: دانشیار، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
Email: e.hajialilo@gmail.com

منابع محیطی دارند و می‌توانند ناقل میکروارگانیسم‌های پاتوژن نیز باشند (۱۱)، لذا آلودگی منابع آبی بویژه آب شرب با آمیب‌ها می‌تواند تهدیدی برای سلامتی افراد باشد، که با شناسایی آمیب می‌توان به پیشگیری و کنترل بیماری کمک شایانی کرد. آمیب‌های آزادزی از آب آشامیدنی بسیاری از نقاط دنیا و از جمله ایران جدا شده‌اند (۱۲-۱۶)، در حالیکه تاکنون در منطقه‌ی مورد مطالعه هیچ گونه بررسی در مورد وفور آمیب‌ها در آب شرب صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی آکانتامبا و نگلریا از آب شرب قزوین با استفاده از روش‌های مورفولوژی و مولکولی بود.

روش‌ها

منطقه‌ی مورد مطالعه و جمع‌آوری نمونه: مطالعه‌ی حاضر از نوع توصیفی می‌باشد، که بر روی آب شرب استان قزوین صورت گرفت. استان قزوین در بخش شمال غربی ایران واقع شده است، که نمونه‌گیری از شهر قزوین انجام شد (شکل ۱). جامعه‌ی مورد مطالعه در این پژوهش آب سرد و گرم لوله‌کشی شهری بود. آب لوله‌کشی سرد چهار نقطه شمال، جنوب، شرق و غرب شهر قزوین، به مقدار ۲۰ نمونه از هر منطقه و در مجموع ۸۰ نمونه آب سرد جمع‌آوری شد. آب لوله‌کشی گرم در هر منطقه ۱۰ نمونه و در مجموع ۴۰ نمونه از چهار منطقه‌ی جغرافیایی شهر قزوین جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری از آب شرب به صورت تصادفی در بهار و تابستان ۱۴۰۰ انجام شد. نمونه‌برداری از آب قابل شرب لوله‌کشی و با استفاده از ظرف استریل به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر انجام شد. دمای آب لوله‌کشی پس از ثابت ماندن دما، برای آب گرم ۲/۵ ± ۴۰ و برای آب سرد ۲/۵ ± ۱۷ ثبت شد، سپس نمونه‌ها برای انجام آزمایشات مورد نظر به آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین منتقل شد.

فیلتراسیون نمونه‌ها: برای جداسازی آمیب از آب شرب، نمونه‌ها به کمک پمپ خلا فیلتر شد. جهت فیلتراسیون از فیلترهای نیترو سلولز با منافذ ۰/۴۵ میکرو متر (۰/۴۵ µm) استفاده شد. هر فیلتر در محیط کشت آگار غیر مغذی باکتری *E. coli* کشته شده، قرار داده شد. محیط‌های کشت در دمای ۳۰-۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه نموده و تا ۳۰ روز پس از کشت از نظر وجود کیست یا تروفوزوئیت آمیب به روش میکروسکوپی بررسی شدند. شناسایی اولیه بر مبنای خصوصیات کیست آمیب و با استفاده از میکروسکپ نوری صورت گرفت. به علت ماهیت دیر رشد بودن برخی گونه‌ها، پلیت‌ها به مدت یک ماه به طور میکروسکوپی بررسی شدند. در نهایت بعد از گذشت یک ماه در صورت عدم مشاهده آمیب، کشت منفی در نظر گرفته شد (۱۷، ۱۸).

استخراج DNA: به سطح پلیت به مقدار ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد، سپس تروفوزوئیت و کیست‌های معلق در آب مقطر جمع‌آوری شدند. استخراج DNA در این پژوهش با استفاده از کیت استخراج DNA از خون و بافت (Roche (Mannheim.Germany و طبق پروتکل شرکت سازنده‌ی کیت تغییراتی جزئی انجام شد.

شکل ۱. منطقه‌ی جغرافیایی محدوده‌ی استان قزوین

کیست‌های آکانتامبا دارای جدار محکمی می‌باشند، لذا در ابتدای استخراج DNA، glass bead و ورتکس نمونه (پنج مرتبه به مدت ۱۰ ثانیه)، جهت شکستن دیواره‌ی کیست انجام شد. در طی مراحل استخراج به مقدار ٤٠ میکرولیتر پروتئیناز k اضافه شد. نمونه به مدت ۳ ساعت و در دمای ٥٦ درجه‌ی سانتی‌گراد با پروتئیناز k در مجاورت بود و هر نیم ساعت ورتکس می‌شد. DNA بدست آمده در فریزر در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش PCR: برای انجام PCR، پرایمرهای اختصاصی JDP1 و JDP2 که زیر مجموعه‌ای از ژن ریبوزومالی 18S rDNA است و گونه‌ی آکانتامبا را به طول تقریبی ۵۰۰ bp تکثیر می‌کند، استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی نگلریا، پرایمرهای اختصاصی NA1 و NA2، نیز برای تکثیر قطعه‌ی ژن 18S rDNA، به طول تقریبی ٤۰۰ bp استفاده شد (جدول ۱) (۱۷، ۱۸). حجم نهایی واکنش ۲۰ µl در نظر گرفته شد. دمای ترموسایکلر برای انجام PCR آکانتامبا در مرحله‌ی Initial denaturating به مقدار ۹٤ °C و به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله Annealing به مقدار ٦٤ °C و به مدت ٤٥ ثانیه و در نهایت مرحله‌ی Extension به مقدار ۷۲ °C و به مدت ٤٥ ثانیه در ۳۵ سیکل تنظیم شد. دمای ترموسایکلر باری انجام PCR نگلریا در مرحله‌ی Initial denaturating به مقدار ۹۵ °C و به مدت ۲۰ ثانیه، مرحله‌ی Annealing به مقدار ۵۷ °C و به مدت ۲۰ ثانیه و در نهایت مرحله‌ی Extension به مقدار ۷۲ °C و به مدت ۳۰ ثانیه در ۳۵ سیکل تنظیم شد.

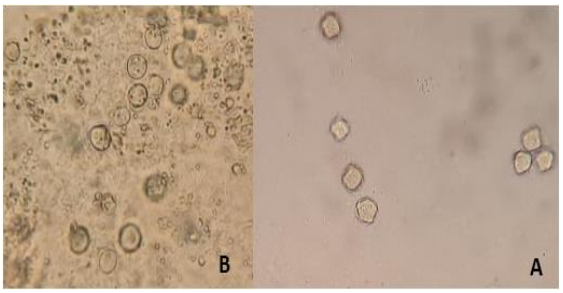
تست پاتوژنیسیته: جهت بررسی میزان پاتوژنیسیته‌ی آکانتامبای بدست آمده، از تست پاتوژنیسیته اسموتولرنس و ترموتولرنس استفاده شد. در تست اسموتولرانس از محیط آگار غیر مغذی به همراه غلظت ۰/۵ و ۱ مولار از قند دی - مانیتول (D - Mannitol) استفاده شد و رشد آمیب روزانه و به مدت ۷ روز با استفاده از میکروسکپ نوری بررسی گردید. در تست ترموتولرانس نمونه‌های مثبت را در دو دمای ۳۷ و ٤۰ درجه قرار داده و رشد آمیب به مدت ۷ روز با استفاده از میکروسکپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (۱۸-۲۰).

آنالیز آماری با استفاده از آزمون Chi-Square و Fisher's exact test انجام شد و معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

این مقاله در دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کد اخلاق IR.QUMS.REC. 1399.427 به تصویب رسیده است.

یافته‌ها

آلودگی به آکانتامبا و نگلریا در نمونه‌های آب شرب قزوین یافت شد (شکل ۲). بر اساس نتایج بررسی مورفولوژی و مولکولی ۲۷ ایزوله آب شرب (۲۲/۵ درصد) آلوده به آمیب‌های آزادزی بودند، که میزان آلودگی به آکانتامبا (۲۰/۱۲۰) ۱٦/۷ درصد و آلودگی به نگلریا (۷/۱۲۰) ٥/٨٤ درصد مشخص شد. یافته‌ها نشان داد که نسبت آلودگی به آکانتامبا در آب شرب شهر قزوین بیشتر از نگلریا می‌باشد. آزمون آماری اختلاف معنی‌داری بین نسبت آلودگی دو آمیب در آب شرب را نشان داد ($P = ۰/۰۰۸$). میزان شیوع آکانتامبا در آب گرم و سرد تفاوت معنی‌داری نشان نداد، در حالیکه میزان شیوع نگلریا در آب گرم بطور معنی‌داری از آب سرد بیشتر بود. طبق یافته‌های بدست آمده، میزان آلودگی در غرب از همه جا بیشتر و در شمال شهر از همه کمتر بود. میزان آلودگی به آکانتامبا در غرب ۸/٤ درصد و نگلریا ۱/٦۷ درصد برآورد شد (جدول ۲). نتایج تست پاتوژنیسیته نشان داد، که (۱۱/۲۰) ۵۵ درصد از ایزوله‌های آکانتامبا پاتوژن هستند و همچنین آزمون آماری ارتباط معنی‌داری بین نوع آب (گرم و سرد) و پاتوژنیسته‌ی نمونه‌های مثبت را نشان داد ($P = ۰/۰۳۵$) (جدول ۳).



شکل ۲. کیست آکانتامبا (A) و نگلریای (B) جدا شده از آب شرب قزوین با استفاده از میکروسکپ نوری

جدول ۱. توالی اولیگونوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن 18S rDNA آکانتامبا و نگلریا

Primer name	Primer	Length
(JDP1) Forward	5-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3	۲۲
(JDP2) Reverse	5-TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA-3	۲۴
(NA1) Forward	5-AACCTGCGTAGGGATCAT-3	۱۸
(NA2) Reverse	5-TTTTCTTTTCCTCCCCTTAT-3	۲۰

جدول ۲. توزیع فراوانی آلودگی آکانتامبا و نگلریا در آب شرب قزوین

مکان نمونه‌گیری	آکانتامبا			نگلریا		
	آب سرد (تعداد: ۸۰)	آب گرم (درصد) تعداد = ۴۰	جمع	آب سرد (درصد) تعداد = ۸۰	آب گرم (درصد) تعداد = ۴۰	جمع
شمال	-	۳ (۷/۵)	۳ (۲/۵)	-	-	-
جنوب	۳ (۳/۷۵)	۳ (۷/۵)	۶ (۵)	۱ (۱/۲۵)	۲ (۵)	۳ (۲/۵)
شرق	-	۱ (۲/۵)	۱ (۰/۸۴)	-	۲ (۵)	۲ (۱/۶۷)
غرب	۷ (۸/۷۵)	۳ (۷/۵)	۱۰ (۸/۴)	۱ (۱/۲۵)	۱ (۲/۵)	۲ (۱/۶۷)
جمع	۱۰ (۱۲/۵)	۱۰ (۲۵)	۲۰ (۱۶/۷)	۲ (۲/۵)	۵ (۱۲/۵)	۷ (۵/۸۴)

جدول ۳. نتایج تست پاتوژنسیته‌ی نمونه‌های آکانتامبا در آب گرم و سرد قزوین

	آب گرم		آب سرد	
	پاتوژن	غیر پاتوژن	پاتوژن	غیر پاتوژن
جنوب	۱	۲	۳	-
شمال	۱	۲	-	-
غرب	۱	۲	۵	۲
شرق	-	۱	-	-
جمع (درصد)	۳ (۳۰)	۷ (۷۰)	۸ (۸۰)	۲ (۲۰)

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، میزان آلودگی به آکانتامبا در آب شرب با استفاده از روش مورفولوژی و مولکولی، بطور معنی‌داری از آلودگی به نگلریا بیشتر بود. در مطالعاتی که بر روی منابع آبی شهرها و استان‌های مختلف ایران از جمله در شیراز، جزیره کیش، بیرجند، استان‌های گیلان و مازندران انجام شد، نشان‌دهنده‌ی میزان آلودگی بیشتر منابع آب با آکانتامبا می‌باشد (۱، ۲۱-۲۳). همچنین در منطقه‌ی مورد مطالعه نیز مطالعاتی بر روی آب استخر و آب کانال کشاورزی انجام شده، که یافته‌های این مطالعات نیز میزان آلودگی به آکانتامبا را بیشتر از نگلریا نشان داده است (۱۷، ۱۸). ضد عفونی کردن آب با کلر رایج‌ترین روش ضد عفونی کردن آب می‌باشد، که نتایج بررسی‌های مختلف نشان‌دهنده‌ی مقاومت آکانتامبا به ضد عفونی‌کننده‌ها است (۲۴، ۲۵).

نتایج تست پاتوژنیسیته در این مطالعه نشان داد، که ۵۵ درصد از ایزوله‌های آکانتامبا پاتوژن هستند و همچنین فراوانی ایزوله‌های پاتوژن در آب سرد و گرم تفاوت معنی‌داری داشت. البته معنی‌داری می‌تواند به علت حجم نمونه بیشتر و فراوانی بیشتر آکانتامبا در آب سرد باشد. تعداد قابل توجه ایزوله‌های پاتوژن در آب شرب می‌تواند از لحاظ بهداشتی زنگ خطری برای دست‌اندرکاران باشد و نکته‌ی مهم، مسأله‌ی همزیستی میکروارگانیسم‌های پاتوژن با آکانتامبا است، که باید مورد توجه قرار گیرد. میکروارگانیسم‌ها از جمله انواع باکتری‌ها و ویروس‌ها می‌توانند درون میزبان آمیب زنده مانده و تکثیر کنند، که اهمیت حضور آکانتامبا در منابع آب شرب را بیشتر می‌کند (۱۱، ۲۶). بیشترین میزان آلودگی در غرب و کمترین میزان آلودگی در شمال شهر مشخص شد. از آن‌جایی که آب شرب منطقه از چاه تأمین می‌شود و بررسی‌ها نشان‌دهنده‌ی ایمن بودن آب برای مصرف‌کننده‌ها است (۲۷)، شیوع متفاوت آمیب در مناطق مختلف جغرافیای شهر می‌تواند به دلیل تفاوت در انتقال آب در سیستم لوله‌کشی در نقاط مختلف شهر باشد. از طرفی شهر قزوین دارای چندین حلقه چاه می‌باشد، که عمدتاً در جنوب شهر واقع شده‌اند. تمامی منابع زیرزمینی جهت تصفیه، به تصفیه‌خانه مرکزی شهر قزوین منتقل شده و جهت انجام مراحل تصفیه‌سازی، حدود ۲۰-۳۰ دقیقه در مخزنی بزرگتر انباشته می‌شوند. این مخازن می‌توانند یکی از علل دیگر آلودگی آب لوله‌کشی به آمیب باشند.

در مطالعه‌ی حاضر، میزان آلودگی به نگلریا ۵/۸۴ درصد در نقاط مختلف مشخص شد. همچنین میزان شیوع نگلریا در آب گرم بطور معنی‌داری از آب سرد بیشتر بود. نگلریا آمیب گرمادوست است، بنابراین شیوع بیشتر این آمیب در آب گرم منطقی می‌باشد. در پژوهش‌های انجام شده از نمونه‌های آب لوله‌کشی در کشورهای مختلف از جمله ژاپن، مصر، نیکاراگوئه و مالزی انجام شده است، که آلودگی به نگلریا مشخص شد (۲۸-۳۱).

در مطالعه‌ی Edagawa و همکاران در ژاپن، دو گونه‌ی نگلریا بنام *N. thihangensis* و *N. australiensis* در آب ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد یافت شد و آلودگی به نگلریا فاولری در این مطالعه یافت نشد. در این مطالعه تقریباً ۷۰ درصد از آب لوله‌کشی آلوده به گونه‌های آکانتامبا و نگلریا بود، که نسبت به مطالعه‌ی ما میزان آلودگی بیشتری گزارش کردند (۲۸).

AI-Herrawy و همکاران در مصر، میزان آلودگی به نگلریا در آب لوله‌کشی و استخر را ۲۵ درصد گزارش کردند (۲۹). مطالعه‌ای که در آب لوله‌کشی مالزی انجام شد، میزان آلودگی به نگلریا را ۲۹/۸ درصد گزارش کرد (۳۱). در مطالعه‌ی دیگری که بر روی آب لوله‌کشی پاکستان انجام شد، ۸ درصد آلودگی به نگلریا فاولری گزارش شد (۱۲).

مطالعه‌ی انجام شده در منابع آبی خراسان در ایران، آلودگی به نگلریا را ۲۱/٦ درصد گزارش کرد (۳۲). نتایج غالب مطالعات، میزان آلودگی به نگلریا را بیشتر از این مطالعه گزارش کردند. البته تنها گونه‌ی نگلریا فاولری بیماری‌زاست (۳۳) و به دلیل محدودیت‌های مطالعه تعیین توالی ایزوله‌ها به منظور شناسایی گونه‌ی آمیب صورت نگرفت. مطالعه‌ی حاضر تنها بررسی آلودگی آب شرب به آمیب‌های آزادزی در منطقه می‌باشد، که با توجه به اهمیت بهداشتی آب شرب باید مطالعات بیشتر و کامل‌تری به منظور تعیین دقیق گونه و ژنوتایپ آمیب‌ها در منطقه صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

از آن‌جایی که آکانتامبا در مصرف‌کنندگان لنزهای تماسی می‌تواند باعث کراتیت شود، لذا نتایج این مطالعه می‌تواند هشداری به جهت اجتناب از شستشوی لنز با آب شرب باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با شماره طرح ۹۹۰۰۰٤٤۷ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین تصویب شد، بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی قزوین به دلیل حمایت مالی از این پژوهش، قدردانی می‌گردد.

References

1. Niyyati M, Lasgerdi Z, Lorenzo-Morales J. Detection and molecular characterization of potentially pathogenic free-living amoebae from water sources in Kish Island, Southern Iran. Microbiol Insights 2015; 8(Suppl 1): 1-6.
2. Siddiqui R, Ahmed Khan N. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. Parasit Vectors 2012; 5(1): 6.
3. Wopereis DB, Bazzo ML, de Macedo JP, Casara F, Golfeto L, Venancio E, et al. Free-living amoebae and their relationship to air quality in hospital environments: characterization of Acanthamoeba spp. obtained from air-conditioning systems. Parasitology 2020; 147(7): 782-90.
4. Ahmed Khan N. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev 2006; 30(4): 564-95.
5. Hajialilo E, Niyyati M, Solaymani M, Rezaeian M. Pathogenic free-living amoebae isolated from contact lenses of keratitis patients. Iran J Parasitol 2015; 10(4): 541-6.
6. Otero-Ruiz A, Gonzalez-Zuñiga LD, Rodriguez-Anaya LZ, Lares-Jiménez LF, Gonzalez-Galaviz JR, Lares-Villa F. Distribution and current state of molecular genetic characterization in pathogenic free-living amoebae. Pathogens 2022; 11(10): 1199.
7. Pugh JJ, Levy RA. Naegleria fowleri: Diagnosis, pathophysiology of brain inflammation, and antimicrobial treatments. ACS Chem Neurosci 2016; 7(9): 1178-9.
8. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 50(1): 1-26.
9. Fanselow N, Sirajuddin N, Yin XT, Huang AJ, Stuart PM. Acanthamoeba keratitis, pathology, diagnosis and treatment. Pathogens 2021; 10(3): 323.
10. Marciano-Cabral F. Biology of Naegleria spp. Microbiol Rev 1988; 52(1): 114-33.
11. Hajialilo E, Rezaeian M, Niyyati M, Pourmand MR, Mohebali M, Norouzi M, et al. Molecular characterization of bacterial, viral and fungal endosymbionts of Acanthamoeba isolates in keratitis patients of Iran. Exp Parasitol 2019; 200: 48-54.
12. Yousuf FA, Siddiqui R, Subhani F, Khan NA. Status of free-living amoebae (Acanthamoeba spp., Naegleria fowleri, Balamuthia mandrillaris) in drinking water supplies in Karachi, Pakistan. J Water Health 2013; 11(2): 371-5.
13. Javanmard E, Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Lasjerdi Z, Behniafar H, Mirjalali H. Molecular identification of waterborne free living amoebae (Acanthamoeba, Naegleria and Vermamoeba) isolated from municipal drinking water and environmental sources, Semnan province, north half of Iran. Exp Parasitol 2017; 183: 240-4.
14. Armand B, Motazedian M, Asgari Q. Isolation and identification of pathogenic free-living amoeba from surface and tap water of Shiraz City using morphological and molecular methods. Parasitol Res 2016; 115(1): 63-8.
15. Maschio VJ, Chies F, Carlesso AM, Carvalho A, Rosa SP, Van Der Sand ST, et al. Acanthamoeba T4, T5 and T11 isolated from mineral water bottles in southern Brazil. Curr Microbiol 2015; 70(1): 6-9.
16. Rivera F, Galvan M, Robles E, Leal P, Gonzalez L, Lacy AM. Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. J Protozool 1981; 28(1): 54-6.
17. Paknejad N, Hajialilo E, Saraei M, Javadi A. Isolation and identification of Acanthamoeba genotypes and Naegleria spp. from the water samples of public swimming pools in Qazvin, Iran. J Water Health 2020; 18(2): 244-51.
18. Khorsandi Rafsanjani M, Hajialilo E, Saraei M, Alizadeh SA, Javadi A. Isolation and molecular identification of Acanthamoeba and Naegleria from agricultural water canal in Qazvin, Iran. Iran J Parasitol 2020; 15(3): 393-402.
19. Khan NA. Pathogenicity, morphology, and differentiation of Acanthamoeba. Curr Microbiol 2001; 43(6): 391-5.
20. Hajialilo E, Behnia M, Tarighi F, Niyyati M, Rezaeian M. Isolation and genotyping of Acanthamoeba strains (T4, T9, and T11) from amoebic keratitis patients in Iran. Parasitol Res 2016; 115(8): 3147-51.
21. Behravan M, Malekaneh M, Mesbahzadeh B, Sharifzadeh G, Namaei MH, Behniafar H, et al. Microscopic isolation and characterization of free

living amoebae [FLA] from surface water sources. in Birjand, the capital city of the South Khorasan [in Persian]. J Birjand Univ Med Sci 2015; 22(2): 161-8.
22. Ghadar-ghadr S, Solhjoo K, Norouz-nejad M, Rohi R, Zia-Jahromi S. Isolation and identification of free living amoeba (Naegleria and Acanthamoeba) in Shiraz water resources by morphological criteria [in Persian]. J Jahrom Univ Med Sci 2012; 10(3): 26-33.
23. Mahmoudi MR, Rahmati B, Seyedpour SH, Karanis P. Occurrence and molecular characterization of free-living amoeba species (*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, and *Saccamoeba limax*) in various surface water resources of Iran. Parasitol Res 2015; 114(12): 4669-74.
24. De Jonckheere J, Van de Voorde H. Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic Naegleria and Acanthamoeba by chlorine. Appl Environ Microbiol 1976; 31(2): 294-7.
25. Kao PM, Hsu BM, Hsu TK, Liu JH, Chang HY, Ji WT, et al. Seasonal distribution of potentially pathogenic Acanthamoeba species from drinking water reservoirs in Taiwan. Environ Sci Pollut Res 2015; 22(5): 3766-73.
26. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clin Microbiol Rev 2004; 17(2): 413-33.
27. Panahifard M, Mahvi A, Asgari A, Nazemi S, Moradnia M. A survey on drinking water quality in qazvin in 2015 [in Persian]. J Rafsanjan Univ Med Sci 2017; 16(1): 3-16.
28. Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Kusuhara Y, Karanis P. Isolation and genotyping of potentially pathogenic Acanthamoeba and Naegleria species from tap-water sources in Osaka, Japan. Parasitol Res 2009; 105(4): 1109-17.
29. AI-Herrawy AZ, Mohamed SH, Ali M, Mohammed AH, Gad MA. Distribution of Naegleria in water resources in Egypt. Egypt J Desert Res 2014; 2: 1-14.
30. 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): 439-46.
31. Gabriel S, Ahmed Khan N, Siddiqui R. Occurrence of free-living amoebae (Acanthamoeba, Balamuthia, Naegleria) in water samples in Peninsular Malaysia. J Water Health 2019; 17(1): 160-71.
32. Ahmadi O, Sharifi Y, Khosravinia N, Moghaddas E, Akhoundi M, Fotouhi-Ardakani R ,et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of free-living amoeba (Naegleria and Acanthamoeba) from treated and untreated drinking water. Gene Rep 2021; 25: 101328.
33. Siddiqui R, Ali IKM, Cope JR, Ahmed Khan N. Biology and pathogenesis of Naegleria fowleri. Acta Trop 2016; 164: 375-94.

DOI: *10.48305/jims.v41.i746.1075*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 746, 2nd Week, February 2024**

Received: 23.09.2023 Accepted: 16.01.2024 Published: 03.02.2024

Isolation and Identification of *Acanthamoeba* and *Naegleria* from Drinking Water of Qazvin, Iran

Pourya Fathollahzadeh[1], Isareza Zare[1], Mohammad Ali Hosseini[2], Amir Javadi[3], Peyman Heydarian[4], Elham Hajialilo[5]

Original Article

Abstract

Background: Free-living amoebae are widely distributed protozoa. It is an opportunistic amphizoic protozoan and can accidentally infect humans. The identification of the amoebae could help to prevent and control the disease. This study was conducted to isolate and identify *Acanthamoeba* and *Naegleria* from the drinking water of Qazvin by using morphological and molecular methods.

Methods: In this study, 120 drinking water samples were taken from both hot and cold waters in different parts of Qazvin, Iran. The samples were cultured to isolate and identify positive specimens. PCR amplification was conducted to confirm the isolated species of the *Acanthamoeba* and *Naegleria.* Evaluation of pathogenicity was conducted by osmo-tolerance and thermo-tolerance assays. Statistical analysis was performed, and $P < 0.05$ was considered significant.

Findings: According to the morphological and molecular analysis, 27 (22.5%) of water isolates were positive for FLA (Free-living amoeba). Among the positive isolates, 16.7% and 5.84% of the specimens were identified as *Acanthamoeba* and *Naegleria* respectively. The statistical analysis showed a significant difference between distributions of the amoeba in drinking water. The results of pathogenicity assays demonstrated that 55% of *Acanthamoeba* was a pathogen.

Conclusion: The present study recommended that more attention should be paid to the proper treatment of drinking water for public health.

Keywords: Acanthamoeba; Naegleria; Drinking water; Qazvin; Iran

Citation: Fathollahzadeh P, Zare I, Hosseini MA, Javadi A, Heydarian P, Hajialilo E. **Isolation and Identification of *Acanthamoeba* and *Naegleria* from drinking Water of Qazvin, Iran.** J Isfahan Med Sch 2024; 41(746): 1075-81.

1- Medical Student, Student Research Committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
2- General Practitioner, Men's Health and Reproductive Health Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Community Medicine, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
4- Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
5- Associate Professor, Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
Corresponding Author: Elham Hajialilo, Associate Professor, Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran; Email: e.hajialilo@gmail.com