Jundishapur
Scientific Medical Journal

September & October 2022. Vol 21. No 4

Research Paper

Determining the Genotype of *Acanthamoeba* Strains Isolated From the Oral and Nasal Cavities of Individuals With Immunodeficiency

Roya Alasvand Javadi[1], Mehdi Tavalla[1], Molouk Beiromvand[1], Samira Razzaghi[2], *Reza Arjmand[3]

1. Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
2. Department of Oncology , Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
3. Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Alasvand Javadi R, Tavalla M, Beiromvand M, Razzaghi S, Arjmand R. [Determining the Genotype of *Acanthamoeba* Strains Isolated From the Oral and Nasal Cavities of Individuals With Immunodeficiency (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2022; 21(4):460-473. https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.4.2181

https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.4.2181

ABSTRACT

Background and Objectives *Acanthamoeba* can cause serious diseases in humans such as amoebic keratitis and granulomatous amebic encephalitis which are most common in immunocompromised individuals. The present study aims to investigate the genotype of *Acanthamoeba* strains isolated from the oral and nasal cavities of immunocompromised individuals.

Subjects and Methods In this study, the samples from the oral and nasal cavities of 179 patients with immunodeficiency were first collected by swap and then transferred to the laboratory of the department of parasitology at Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences. They were cultured in basic agar medium and positive samples were used for molecular studies.

Results Of 179 patients, the samples of 6 people were positive for *Acanthamoeba*. They were sequenced and belonged to the T4 genotype. There was a significant difference between positive samples obtained from oral (4%) and nasal (1.5%) cavities.

Conclusion The prevalence of infection with *Acanthamoeba* parasite is higher in immunocompromised individuals.

Keywords *Acanthamoeba*, Free-living amoebae, Oral and nasal cavities, Immunodeficiency

Received: 15 Aug 2020
Accepted: 29 Dec 2021
Available Online: 23 Sep 2022

Corresponding Author:
Reza Arjmand, Assistant Professor.
Address: Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
Tel: +98 (916) 1135448
E-Mail: arjmand.reza@yahoo.com

Jundishapur
Scientific Medical Journal

Extended Abstract

Introduction

Acanthamoeba is a free-living amoeba that can be found in various environments. It is found in ear, nose and pharyngeal mucosa of patients with respiratory problems .This is the most common protozoan found in the environment. The antibodies against *Acanthamoeba* antigens have been found in the serum of more than 80% of people with complete immunity, which indicates high human contact with this amoeba. *Acanthamoeba* is the cause of human diseases such as amoebic keratitis and granulomatous amebic encephalitis, which is mostly seen in immunocompromised people.

Skin wounds and nasopharyngeal infections caused by this amoeba have also been observed, mostly in people with AIDS. Based on rRNA gene sequence determination, *Acanthamoeba* genus is divided into 12 different genotypes (T1 to T12). Most human *Acanthamoeba* infections are related to the T4 genotype.

Studies have shown that the number of amoebic keratitis is increasing worldwide due to use of contact lenses. *Acanthamoeba* genotyping is a useful tool for taxonomic and epidemiological studies. It explains the relationships between infectious isolates and the phenotype of the disease. Since different strains show different pathogenic power, determining the strains with high pathogenic power can have more therapeutic importance. More studies to identify pathogenic features and genetic markers are needed to clarify this matter. The present study aims to determine the genotype of *Acanthamoeba* strains isolated from the oral cavity of people with immunodeficiency.

Methods

This cross-sectional descriptive study was conducted for 18 months.

The samples were collected with a sterile swab from pharyngeal or nasal secretions of 179 eligible patients in Golestan and Shafa hospitals in Ahvaz, Iran in 2019. The patients who had immunodeficiency with various underlying diseases including diabetes, AIDS, those who were under treatment with chemotherapy drugs and steroids, as well as dialysis patients were included in the study. In the university laboratory, the swab soaked in secretions was cultured on basic agar medium. Before closing the environment, it was autoclaved for 15 minutes at 121°C and divided into plates under the hood. The plates were fixed with parafilm and kept in refrigerator at 4°C. To detect *Acanthamoeba*, all samples were cultured separately in a non-nutrient medium (1.5% Bacto agar) along with an old medium of *Escherichia coli*. Then, bacteria were added to the medium to provide a good source of food for amoeba. The media were incubated at a room temperature and microscopic observation was done on days 2-14 to identify the samples positive for *Acanthamoeba*. All positive amoebae isolates can be cloned by subculturing method to produce pure culture for extracting pure DNA. Therefore, the existing parasites were transferred to new plates. To determine the genotype of the target sample, after cultivation using the primers presented in Table 1, polymerase chain reaction (PCR) was performed under the conditions shown in Table 2.

Table 1. Primers used in the study

Acanthamoeba spp.	18S rRNA	JDP1	5′-GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3′	423–551 bp
		JDP2	5′-TCT CAC AAG CTG CTA GGG AGT CA-3′	

Jundishapur
Scientific Medical Journal

Table 2. PCR specifications using JDP1 and JDP2 primers

Steps	Temperature (°C)	Time	Cycle
Pre-denaturation	94	2 min	1
Denaturation Annealing Extension	94 50 72	30 sec 30 sec 30 sec	35
Post-extension	72	5 min	1

Jundishapur
Scientific Medical Journal

Table 3. Values required to start PCR

Master Mix	Diluted Primer G1	Diluted Primer G2	DNA	DW
12.5 µL	2 µL	2 µL	7 µL	1.5 µL

Jundishapur
Scientific Medical Journal

Table 4. Information related to collected samples and type of disease in patients

Group		No. (%)
Samples	Positive	6(3.4)
	Negative	173(96.6)
	Total	179(100)
Sampling site	Throat	99(55.3)
	Nose	80(44.7)
	Total	179(100)
Type of disease	Diabetes	59(32.9)
	Under chemotherapy	89(49.7)
	Dialysis	29(16.2)
	HIV	2(1.8)
	Total	179(100)

Jundishapur
Scientific Medical Journal

Jundishapur
Scientific Medical Journal

Figure 1. Observing the 500-bp bands related to *Acanthamoeba* on the agarose gel. Lane M: Standard DNA marker (1kb DNA size), Lane 1: Positive control, Lane 2: Negative control, Lanes 3-13: Examined samples.

For PCR, first a 25 microliter of master mix was prepared. After a short centrifuge, the PCR reaction solution was placed in a thermocycler. Table 3 shows the compounds used in the PCR reaction for the ITS1 gene in this study. The primers were diluted. For this purpose, 180 µL of distilled water and 20 µL of primer were added to two micro-tubes named as diluted G_1 and diluted G_2.

To determine the genotype of *Acanthamoeba* isolated from patients, the PCR product was finally determined and the information related to sequencing of the fragment for each sample was compared with the information available in the gene bank, and the genotype of the amoeba was finally determined. Statistical analysis was done using SPSS software, version 22.

Results

In this study, 110 men and 69 women participated. Most of them (n=48, 26.8%) were at the age group of 60-69 years, and the mean age of participants was 48±1 years. As shown in Table 4, 99 samples were taken from the throat and 80 samples were taken from the nose of patients. Among the samples examined by PCR, 6(3.4%) were positive to *Acanthamoeba*, collected from the oral (n=4) and nasal (n=2) cavities of patients. *Acanthamoeba* was identified in the medium by observing star-shaped cysts. The PCR analysis was successfully performed on these samples and the nucleotide sequence was determined for them. All positive samples of T4 genotype were obtained. The PCR analysis was confirmed by observing the 500-bp band on agarose gel (Figure 1).

Conclusion

The prevalence of infection with *Acanthamoeba* parasite in patients with immunodeficiency is higher. The *Acanthamoeba* positive samples identified in these people belong to the T4 genotype.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All ethical principles were observed in this study. This study was approved by the ethics committee of Ahvaz Judishapur university of Medical Sciences (code: IR.AJUMS.MEDICINE.REC.1398.015).

Funding

This study was extracted from the master thesis of Roya Allasvand Javadi, funded by Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences (Grant No.: OG-9828)

Authors contributions

Conceptualization: Reza Arjmand, Mehdi Tavalla; Investigation,: Roya Allasvand Javadi, Reza Arjmand, Samira Razzaghi; Writing original draft: Roya Allsvand Javadi, Reza Arjmand; Review & Editing: Reza Arjmand, Mehdi Tavalla, Molouk Beiromvand; Supervision: Reza Arjmand, Mehdi Tavalla, Molouk Beiromvand; Methodology: All authors.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Infectious and Tropical Diseases Research Center of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences.

This Page Intentionally Left Blank

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور
مهر و آبان ۱۴۰۱. دوره ۲۱. شماره ۴

مقاله پژوهشی

تعیین ژنوتایپ استرین‌های آکانتامبا جداشده از حلق و بینی افراد با نقص سیستم ایمنی

رویا علاسوند جوادی[۱]، مهدی تولا[۱]، ملوک بیرم وند[۱]، سمیرا رزاقی[۲]، *رضا ارجمند[۳]

۱. گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۲. گروه انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Alasvand Javadi R, Tavalla M, Beiromvand M, Razzaghi S, Arjmand R. [Determining the Genotype of *Acanthamoeba* Strains Isolated From the Oral and Nasal Cavities of Individuals With Immunodeficiency (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2022; 21(4):460-473. https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.4.2181

https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.4.2181

CC BY NC

چکیده

زمینه و هدف آکانتامبا می‌تواند بیماری‌های انسانی وخیم ازجمله کراتیت آمیبی و انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز را ایجاد کند که اکثراً در افراد با نقص سیستم ایمنی دیده می‌شود. پژوهش حاضر به بررسی ژنوتایپ استرین‌های آکانتامبا جداشده از حلق و بینی افراد با نقص سیستم ایمنی پرداخته است.

روش بررسی ترشحات حلق و بینی ۱۷۹ بیمار سندرم نقص ایمنی با سوآپ نمونه‌گیری شد. پس از انتقال به آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز در محیط آگار پایه کشت داده شد و نمونه‌های مثبت جهت انجام آزمایش مولکولی استفاده شد.

یافته‌ها از مجموع ۱۷۹ بیمار مورد مطالعه، ۶ نمونه ازنظر وجود آمیب مثبت بودند و برای همه موارد مثبت تعیین توالی انجام شد و همه ۶ سویه شناخته‌شده ژنوتایپ T4 بودند. تفاوت آماری معناداری میان نمونه‌های مثبت ترشحات حلق (۴ درصد) با نمونه‌های مثبت ترشحات بینی (۱/۵ درصد) وجود داشت.

نتیجه‌گیری نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان داد که میزان آلودگی افراد با نقص سیستم ایمنی به انگل آکانتامبا در جمعیت مورد مطالعه بیش از سایر افراد است.

کلیدواژه‌ها آکانتامبا، آمیب آزاد، حفره‌های دهان و بینی، نقص ایمنی

تاریخ دریافت: ۲۵ مرداد ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۰۸ دی ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۰۱ مهر ۱۴۰۱

* **نویسنده مسئول:**
رضا ارجمند
نشانی: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، پژوهشکده سلامت، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری.
تلفن: ۱۱۳۵۴۴۸ (۹۱۶) ۹۸+
رایانامه: arjmand.reza@yahoo.com

مقدمه

آکانتامبا یک آمیب فرصت‌طلب با زندگی آزاد است که در محیط‌های مختلفی مانند آب، خاک، گردوغبار، استخر، فاضلاب، لنزهای چشمی و ظروف نگهدارنده لنز، آب معدنی داخل بطری، یونیت‌های دندان‌پزشکی، دستگاه دیالیز، محیط‌های کشت، ترشحات گوش و بینی و مخاط حلق بیماران با ناراحتی‌های تنفسی یافت می‌شود [۱]. این آمیب شایع‌ترین تک یاخته‌ای است که در محیط یافت می‌شود. همچنین آنتی‌بادی ضدآنتی‌ژن‌های آکانتامبا در سرم بیش از ۸۰ درصد افراد با ایمنی کامل دیده شده که نشانگر تماس بالای انسان با این آمیب است [۲].

آکانتامبا می‌تواند بیماری‌های انسانی وخیم ازجمله کراتیت آمیبی و بیماری نادر و کشنده انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز را ایجاد کند که اکثراً در افراد با نقص سیستم ایمنی دیده می‌شود. زخم‌های پوستی و عفونت‌های نازو فارنشیال ناشی از این انگل نیز دیده شده است که بیشتر در افراد مبتلا به ایدز ایجاد می‌شود. امروزه براساس تعیین توالی ژن rRNA، جنس آکانتامبا به ۱۲ ژنوتیپ مختلف تقسیم می‌شود که با شماره‌های ۱ تا ۱۲ نام‌گذاری می‌شوند (T1-T12). در این تقسیم‌بندی تفاوت هر ژنوتیپ از ژنوتیپ دیگر ۵ درصد یا بیشتر است [۳]. بیشترین عفونت‌های آکانتامبایی انسان مر بوط به ژنوتیپ T4 است. در سال‌های اخیر، به‌دلیل افزایش شمار بیماری‌های نقص سیستم ایمنی مانند ایدز، هپاتیت و سرطان، بروز این عفونت‌ها افزایش یافته است [۴].

همچنین مطالعات نشان می‌دهند که کراتیت آمیبی در ایران و جهان به‌علت استفاده از لنزهای تماسی، رو به افزایش است. یکی از مواردی که می‌تواند در امر شناختن دقیق عوامل بیماری و سپس کنترل آن حائز اهمیت باشد، ژنوتایپینگ سویه‌های مختلف انگل است. ژنوتایپینگ شامل طیف وسیعی از برنامه‌های کاربردی مورد استفاده برای تجزیه‌وتحلیل تفاوت‌های ژنتیکی بین افراد و یا سلول‌ها می‌باشد. این فرایند در تمام زمینه‌های مهم مطالعه علمی ازجمله سرطان، پزشکی قانونی و تحقیقات کشاورزی استفاده می‌شود [۵]. همچنین ژنوتایپینگ آکانتامبا یک ابزار مفید جهت مطالعه تاکسونومیک و روابط اپیدمیولوژیک است. درنتیجه اجازه می‌دهد روابط میان ایزوله‌های عفونت‌زا و فنوتیپ بیماری مثل فاکتورهای بیماری‌زایی، حساسیت دارویی و غیره توضیح داده شوند [۶]. ازآنجاکه استرین‌های مختلف، قدرت بیماری‌زایی متفاوتی از خود نشان می‌دهند، تعیین استرین با قدرت بیماری‌زایی بیشتر، اهمیت درمانی بیشتری خواهد داشت.

مطالعات بیشتری برای شناسائی خصوصیات بیماری‌زایی و مارکرهای ژنتیکی جهت روشن شدن این امر ضروری است. پژوهش حاضر جهت تعیین ژنوتایپ استرین‌های آکانتامبا جداشده از حلق و بینی افراد با نقص سیستم ایمنی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی مقطعی و به‌مدت ۱۸ ماه انجام شد.

جمعیت مورد مطالعه

نمونه‌های مورد آزمایش از مراجعان بیمارستان‌های گلستان و شفا شهر اهواز در سال ۹۸ گردآوری شد که شرایط شرکت در مطالعه را پذیرفتند. جمعیت مورد مطالعه بیمارانی بودند که نقص ایمنی همراه با بیماری‌های زمینه‌ای مختلف شامل دیابت، ایدز داشتند، کسانی که تحت درمان با داروهای شیمی درمانی و استروئیدها قرار داشتند و نیز بیماران دیالیزی بودند. پس از کسب رضایت‌مندی کتبی از آن‌ها، اطلاعات جمعیت‌شناختی به‌صورت شفاهی دریافت و به‌وسیله پژوهشگر ثبت شد.

روش نمونه‌گیری

از هر بیمار یک نمونه با سوآپ استریل (از ترشحات حلق یا بینی، به‌صورت تصادفی) گرفته شد. این کار با استفاده از سوآپ‌های استریل و انتقال به محیط کشت انجام شد و نمونه‌ها جهت ادامه بررسی‌ها به آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز منتقل شدند.

کشت نمونه

در آزمایشگاه دانشگاه، سوآپ آغشته به ترشحات بر روی محیط آگار پایه کشت داده شد. این محیط با استفاده از پودر باکتوآگار به‌صورت ۱/۵ درصد تهیه می‌شد و در پلیت‌های استریل یک‌بار مصرف ریخته می‌شد تا کاملاً ببندد. پیش از بسته شدن محیط، به‌مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو و در زیر هود در پلیت‌ها تقسیم می‌شد. دور پلیت‌ها با پارافیلم بسته شد و در یخچال با ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

جهت تشخیص آکانتامبا، تمامی نمونه‌ها به‌صورت جداگانه در محیط کشت غیرمغذی باکتوآگار ۱/۵ درصد همراه با کشت کهنه‌ای از اشرشیاکلی، کشت داده شدند. سپس به محیط کشت، باکتری اضافه شد تا منبع غذایی خوبی برای آمیب تهیه شود. محیط‌ها در دمای اتاق انکوبه شدند. در روزهای دوم تا چهاردهم هر روز به مشاهده میکروسکوپی پرداخته شد تا نمونه مثبت ازنظر آکانتامبا شناسایی شود. همه ایزوله‌های آمیبی مثبت، برای تولید کشت خالص به منظور استخراج DNA خالص می‌توان به‌روش ساب کالچرینگ[1] کلون کرد و بدین منظور انگل‌های موجود به پلیت‌های جدید انتقال داده می‌شد.

آزمایش ملکولی

از مجموع ۱۷۹ نمونه، تعداد ۵۰ مورد آن جهت استخراج DNA

1. Sub-culturing

جدا شد. جدا کردن نمونه جهت استخراج روی سطح پلیت چند سی سی محلول PBS ریخته می‌شد و با اسکراپر[2] سطح پلیت با محلول بافر توسط سمپلر[3] به میکروتیوپ انتقال داده می‌شد و سپس سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰ و زمان ۵ دقیقه رسوب حاصل جهت مراحل بعدی جدا شد. مراحل استخراج مطابق با بروشور کیت جینت بایو[4] (کره جنوبیGeNet Bio) انجام شد. محصول استخراج در واکنش زنجیرهای پلیمراز[5] استفاده شد. از پرایمرهای JDP1 و JDP2 جهت تکثیر ناحیه ASA.S1 سکانس کامل ژن 18S rRNA آکانتامبا به اندازه 420-550 bp استفاده شد [۷].

جهت تعیین ژنوتایپ نمونه مورد نظر، پس از کشت با استفاده از پرایمرهای فوق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شرایط زیر انجام شد.

روش انجام PCR

جهت تسریع کار بایستی مخلوط اصلی مستر میکس[6] (سینا کلون، ایران) آماده شود. در این مطالعه، PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. پس از یک سانتریفوژ کوتاه، محلول واکنش PCR در ترموسایکلر قرار داده شد (جدول شماره ۱). جدول شماره ۲ پرایمرهای مورد استفاده واکنش PCR را برای ژن TS1ادر این مطالعه نشان می‌دهد. جهت شروع PCR بنا به میزان در نظر گرفته‌شده که در این مطالعه به شرح جدول شماره ۳ بود، مقادیر مربوطه اضافه شد.

سکونسینگ

به منظور تعیین ژنوتایپ اکانتامباهای جداشده از بیماران، محصول PCR در نهایت تعیین توالی و اطلاعات مربوط به توالی قطعه مربوط به هر نمونه با اطلاعات موجود در بانک ژن مقایسه شد و ژنوتیپ آمیب تعیین می‌شد.

آزمون‌های آماری

برای تحلیل داده‌ها از نسخه ۲۳نرم‌افزار SPSS استفاده شد و به منظور ارتباط سنجی پارامترهای مختلف از آزمون کای دو پاکای اسکوئر[7] یا آزمون دقیق فیشر[8] با سطح معناداری ۰/۰۵>استفاده شد.

2. Scraper
3. Sampler
4. GeNet Bio
5. PCR: Polymerase Chain Reaction
6. Master Mix
7. Chi Square
8. Fishers exact test

جدول ۱. برنامه زمانی PCR با پرایمرهای JDP1 و JDP2

مراحل	درجه (℃)	زمان	چرخه
ذوب اولیه	۹۴	۲ دقیقه	۱
ذوب اتصال طویل‌سازی	۹۴ ۵۰ ۷۲	۳۰ ثانیه ۳۰ ثانیه ۳۰ ثانیه	۳۵
طویل‌سازی نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

جدول ۲.پرایمرها جهت استفاده در این مطالعه

ارگانیسم	ژن هدف	نام	ردیف نوکلئوتیدی	سایز محصولات
Acanthamoeba spp.	18S rRNA	JDP1	5′-GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3′	423–551 bp
		JDP2	5′-TCT CAC AAG CTG CTA GGG AGT CA-3′	

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

جدول ۳. مقادیر مورد نیاز جهت شروع PCR

مستر میکس	پرایمر رقیق‌شده G_1(F)	پرایمر رقیق‌شده G_2(R)	DNA	D.W
۱۲/۵ میکرولیتر	۲ میکرولیتر	۲ میکرولیتر	۷ میکرولیتر	۱/۵ میکرولیتر

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

جدول ۴. فراوانی افراد مورد مطالعه برحسب جنسیت

جنسیت	تعداد (درصد)
مرد	۱۱۰(۶۱/۵)
زن	۶۹(۳۸/۵)
جمع	۱۷۹(۱۰۰)

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

جدول ۵. فراوانی افراد مورد مطالعه برحسب سن

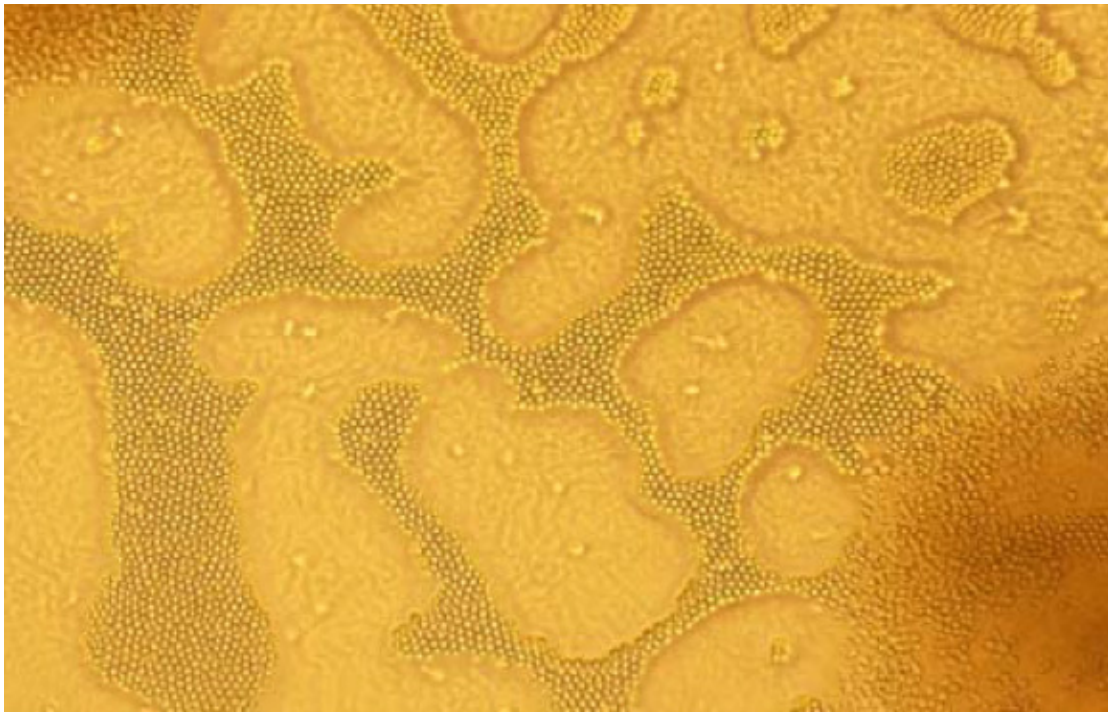
سن	تعداد (درصد)
۳۰-۲۰	۳۰(۱۶/۸)
۴۰-۳۰	۲۲(۱۲/۳)
۵۰-۴۰	۴۰(۲۲/۳)
۶۰-۵۰	۳۹(۲۱/۸)
۶۹-۶۰	۴۸(۲۶/۸)
جمع	۱۷۹(۱۰۰/۰)

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

جدول ۶. اطلاعات مربوط به نمونه‌گیری و نوع بیماری افراد مورد بررسی

گروه		(درصد)
موارد	مثبت	۶(۳/۴)
	منفی	۱۷۳(۹۶/۶)
	جمع	۱۷۹(۱۰۰)
محل نمونه‌گیری	حلق	۹۹(۵۵/۳)
	بینی	۸۰(۴۴/۷)
	جمع	۱۷۹(۱۰۰)
نوع بیماری	دیابت	۵۹(۳۲/۹)
	شیمی درمانی	۸۹(۴۹/۷)
	دیالیز	۲۹(۱۶/۲)
	HIV	۲(۱/۸)
	جمع	۱۷۹(۱۰۰)

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور



تصویر ۱. کیست ستاره شکل در محیط آگار غیر مغذی حاوی باکتری اشرشیای کشته‌شده، بزرگ‌نمایی ۴۰

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

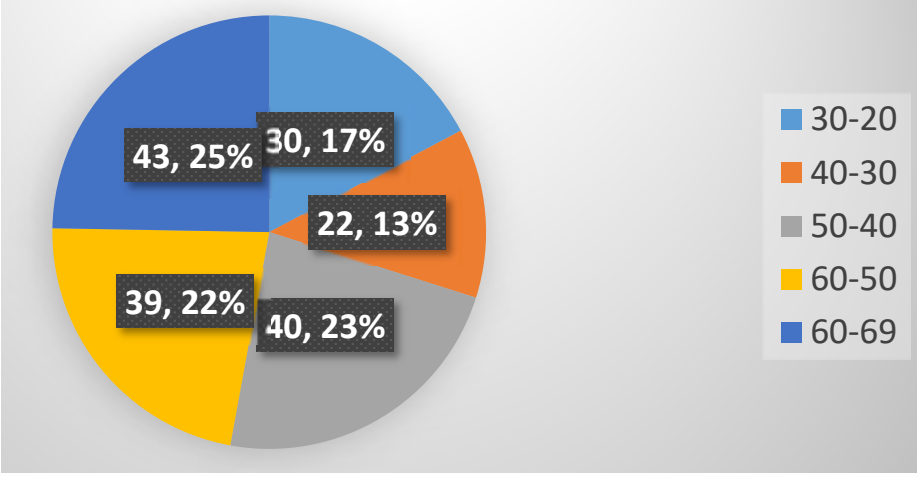
یافته‌ها

شناسایی آمیب آکانتامبا در محیط کشت، براساس دیدن کیست ستاره‌ای شکل صورت گرفت (تصویر شماره ۱). تحلیل PCR بر روی نمونه‌های مثبت، با استفاده از پرایمرهای JDP و JDP1 2 انجام و با مشاهده باند bp 500 برروی ژل آگارز، تأیید شد (تصویر شماره ۲).

همان‌طورکه در جدول شماره ۴ نشان داده شده است، در مطالعه حاضر ۱۱۰ مرد و ۶۹ زن مورد بررسی قرار گرفتند. براساس اطلاعات تصویر شماره ۳ و جدول شماره ۵ بیشترین افراد شرکت‌کننده در گروه سنی ۶۰-۶۹ سال و میانگین سن افراد مورد بررسی ۴۸ سال با انحراف‌معیار ۱۲ می‌باشد.

تصویر ۲. مشاهده باند ۵۰۰ Bp آکانتامبا بر روی ژل آگاروز؛ M: سایز مارکر؛ ۱: کنترل مثبت؛ ۲: کنترل منفی؛ ۳-۱۳: نمونه‌های بیماران

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور



تصویر ۳. فراوانی افراد مورد مطالعه برحسب سن

همان‌گونه که جدول شماره ۶ نشان می‌دهد محل نمونه‌گیری ۹۹ نمونه از حلق و ۸۰ نمونه از بینی بود. از کل نمونه‌های مورد بررسی نتایج PCR، ۶ نمونه مثبت شد. در این بررسی، از بین ۱۷۹ نمونه مورد مطالعه، در مجموع ۶ نمونه (۳/۴ درصد) آمیب آکانتامبا از ترشحات دهان (۴ مورد) و بینی (۲ مورد) بیماران مورد مطالعه شناسایی شد.

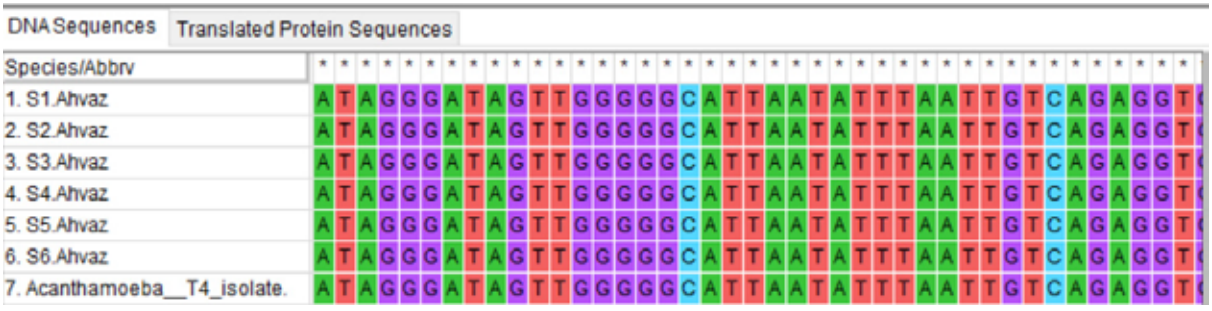
واکنش PCR درمورد تمام نمونه‌های کشت مثبت، با موفقیت انجام شد و تعیین توالی نوکلئوتیدی برای همه نمونه‌ها صورت گرفت. تمامی نمونه‌های مثبت ژنوتایپ T4 به دست آمد (تصویر شماره ۴).

بحث

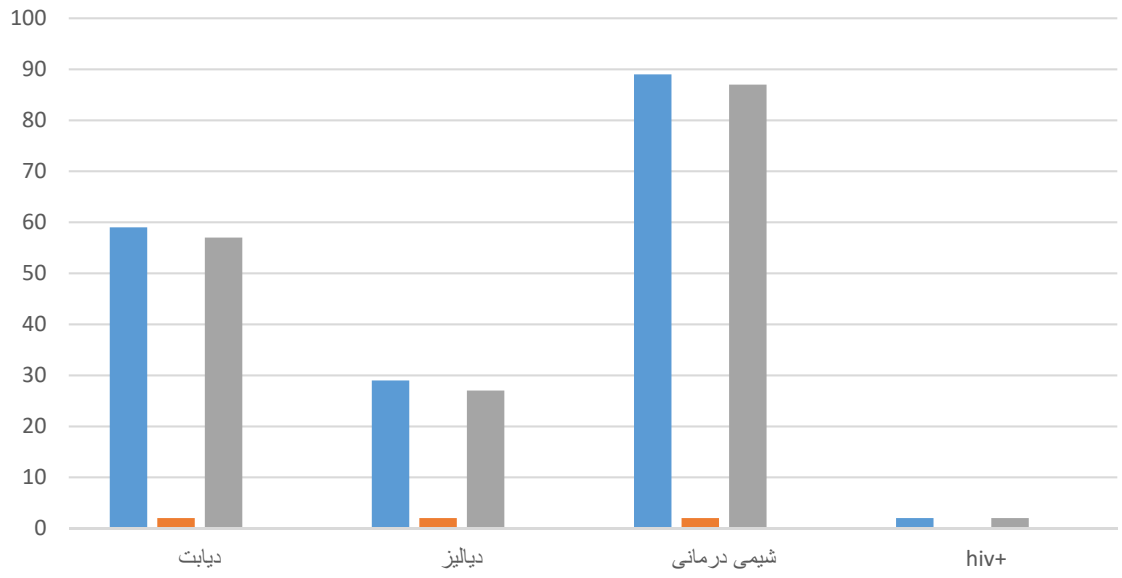
آمیب آکانتامبا می‌تواند بیماری‌های انسانی وخیم ازجمله کراتیت آمیبی و بیماری نادر و کشنده انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز را ایجاد کند. زخم‌های پوستی و عفونت‌های نازو فارنشیال ناشی از این انگل نیز دیده شده است که بیشتر در افراد ایدزی ایجاد می‌شود. پروگنوز آن به‌شدت ضعیف است و نیاز به تشخیص سریع و درمان موفقیت‌آمیز دارد [۸]. امروزه بالغ بر ۲۰ زنوتایپ مختلف برای آکانتامبا شناسایی شده است که ژنوتیپ T4 شایع‌ترین ژنوتایپ و ژنوتایپ غالب درگیر در عفونت‌های کراتیت اکانتامبایی است. زنوتایپینگ آکانتامبا یک ابزار مفید جهت مطالعه تاکسونومیک و روابط اپیدمیولوژیک است. درنتیجه اجازه می‌دهد روابط میان ایزوله‌های عفونت‌زا و فنوتیپ بیماری مثل فاکتورهای بیماری‌زایی، حساسیت دارویی و غیره توضیح داده شود [۹].

یکی از مهم‌ترین راه‌های ورود آمیب آکانتامبا به بدن انسان بینی و دهان است و کیست‌های این انگل از این طریق وارد بدن انسان می‌شوند. به‌دلیل انتشار فراوان انگل آکانتامبا در آب، هوا و خاک در اطراف انسان، ورود آن‌ها به بدن انسان غیر منتظره نیست. همچنین این آمیب یک انگل فرصت‌طلب نیز محسوب می‌شود، زیرا اکثر مواردِ خطرناک آن از بیمارانی با اختلال سیستم ایمنی مانند افراد دریافت‌کننده عضو (پیوند عضو) و بیماران مبتلا به ایدز گزارش شده است [۱۰].

ازآنجاکه آکانتامبا یک پاتوژن فرصت‌طلب است، یکی از مهم‌ترین فاکتورهای ایجاد عفونت وضعیت سیستم ایمنی بدن است. بنابراین، آن دسته از بیمارانی که سرکوب سیستم ایمنی



تصویر ۴. نتیجه تعیین توالی نمونه‌های مثبت



تصویر ۵. مقایسه موارد مثبت و منفی برحسب بیماری زمینه‌ای

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

دارند، بخشی از جمعیت هستند که می‌توانند به‌عنوان افراد پرخطر در نظر گرفته شوند. ازاین‌رو اهمیت یافتن گونه‌های بالقوه بیماری‌زای آکانتاموبا در بیماران دارای نقص ایمنی بسیار بالا است. در این مطالعه آزمایش-کنترل به بررسی میزان آلودگی نمونه‌های به‌دست‌آمده از ترشحات دهان و بینی بیماران با نقص سیستم ایمنی به این انگل و تعیین ژنوتایپ موارد مثبت با روش مولکولی پرداخته شد.

نتایج مطالعه کنونی نیز مؤید حساسیت بیشتر افراد دچار اختلال و تضعیف سیستم ایمنی در برابر این انگل بود (تصویر شماره ۵)، به‌طوری‌که از کل نمونه‌های مورد بررسی نتایج PCR، در مجموع ۶ نمونه (۳/۴) مثبت شد که درمقایسه با نتایج مطالعات مشابه دیگری که بر روی افراد مبتلا به سرطان و افراد دچار اختلال ایمنی در ایران انجام شد، بسیار کمتر است. مطالعات قبلی در ایران حضور ژنوتیپ‌های بالقوه پاتوژن آکانتامبا از منابع غبار و بیوفیلم در بیمارستان‌های مختلف گزارش کرده‌اند [۷، ۱۱].

نتایج برخی از مطالعات، ارتباط کلونیزه شدن این انگل با میزان حساسیت و وضعیت سیستم ایمنی فرد را نشان داده است. برای مثال، معماری و همکاران در سال‌های ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ میزان آلودگی ترشحات بینی و دهان به انگل آکانتامبا را در افراد دچار سرطان و اختلالات ایمنی به‌ترتیب ۴۵ و ۱۳/۴ درصد گزارش کردند [۱۲، ۱۳]. بررسی سواب‌های بینی جمع‌آوری‌شده از بیماران سرطانی در ایران، نشانگر وجود ژنوتیپ‌های T4، T3 و T5 در این منابع است، نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که ۹ سویه جداشده متعلق به ژنوتیپ T4 آکانتامبا با پتانسیل بیماری‌زایی بالاست که مشابه نتایج مطالعه حاضر است که نشان داد تمام ۶ سویه شناسایی‌شده متعلق به ژنوتیپ T4 هستند [۱۲].

در مطالعه‌ای در این زمینه در کشور پرو نشان داده شد که از ۷۴ نمونه سواب بینی از افراد سالم، ۲۱ نفر (۲۸/۴ درصد) ازنظر آکانتامبا مثبت بودند، ژنوتیپ‌های T4 و T15 شناسایی شد [۱۴]. باوجوداین، مطالعات قبلی گزارش داده‌اند که فراوانی بالای ژنوتیپ T4 ممکن است به‌دلیل حدت بیشتر آن باشد که مطابق با مطالعه فعلی و قبلی است [۱۲، ۱۴، ۱۵].

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان داد که میزان آلودگی افراد با نقص سیستم ایمنی به انگل آکانتامبا در جمعیت مورد مطالعه به میزان ۳/۴ درصد است. همچنین تمام نمونه‌های مثبت با ژنوتایپ T4 شناسایی شدند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

تمامی اصول اخلاقی در این مقاله رعایت شده است. این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با کد IR.AJUMS.MEDICINE.REC.1398.015 تأیید شده است.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رویا علاسوند جوادی با شماره طرح OG-9828 در دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز است. این پژوهش هیچ‌گونه کمک مالی از سازمانی‌های دولتی، خصوصی و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی: رضا ارجمند و مهدی تولا؛ تحقیق و بررسی: رویا علاسوند جوادی، رضا ارجمند و سمیرا رزاقی؛ نگارش پیش‌نویس اصلی: رویا علاسوند جوادی و رضا ارجمند؛ نگارش، نقد و ویرایش: رضا ارجمند، مهدی تولا و ملوک بیرموند؛ سرپرستی: رضا ارجمند، مهدی تولا و ملوک بیرموند؛ روش‌شناسی: همه نویسندگان.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تشکر و قدردانی می‌کنند.

Jundishapur
Scientific Medical Journal

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. [PMID]

[2] Khan NA. Acanthamoeba: Biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006; 30(4):564-95. [DOI:10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x] [PMID]

[3] Coronado-Velázquez D, Silva-Olivares A, Castro-Muñozledo F, Lares-Jiménez LF, Rodríguez-Anaya LZ, Shibayama M, et al. Acanthamoeba mauritaniensis genotype T4D: An environmental isolate displays pathogenic behavior. Parasitol Int. 2020; 74:102002. [DOI:10.1016/j.parint.2019.102002] [PMID]

[4] Memari F, Niyyati M, Joneidi Z. Pathogenic Acanthamoeba T4 genotype isolated from mucosal tissue of a patient with HIV infection: A case report. Iran J Parasitol. 2017; 12(1):143-7. [PMID] [PMCID]

[5] Donelli G, Vuotto C, Mastromarino P. Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. Microb Ecol Health Dis. 2013; 24. [DOI:10.3402/mehd.v24i0.20105] [PMID] [PMCID]

[6] Corsaro D, Köhsler M, Montalbano Di Filippo M, Venditti D, Monno R, Di Cave D, et al. Update on Acanthamoeba jacobsi genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. Parasitol Res. 2017; 116(4):1273-84. [DOI:10.1007/s00436-017-5406-1] [PMID]

[7] Lasjerdi Z, Niyyati M, Haghighi A, Shahabi S, Biderouni FT, Taghipour N, et al. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. Parasitol Res. 2011; 109(3):575-80. [PMID]

[8] Arnalich-Montiel F, Lumbreras-Fernández B, Martín-Navarro CM, Valladares B, Lopez-Velez R, Morcillo-Laiz R, et al. Influence of Acanthamoeba genotype on clinical course and outcomes for patients with Acanthamoeba keratitis in Spain. J Clin Microbiol. 2014; 52(4):1213-6. [PMID] [PMCID]

[9] Siddiqui R, Iqbal J, Maugueret MJ, Khan NA. The role of Src kinase in the biology and pathogenesis of Acanthamoeba castellanii. Parasit Vectors. 2012; 5:112. [PMID] [PMCID]

[10] Meighani M, Eslamirad Z, Hajihossein R, Ahmadi A, Saki S. Isolation and genotyping of Acanthamoeba from soil samples in Markazi province, Iran. Open Access Maced J Med Sci. 2018; 6(12):2290-4. [PMID] [PMCID]

[11] Lasjerdi Z, Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Haghighi A, Taghipour N. Ophthalmology hospital wards contamination to pathogenic free living Amoebae in Iran. Acta Parasitol. 2015; 60(3):417-22. [DOI:10.1515/ap-2015-0057] [PMID]

[12] Memari F, Niyyati M, Haghighi A, Seyyed Tabaei SJ, Lasjerdi Z. Occurrence of pathogenic Acanthamoeba genotypes in nasal swabs of cancer patients in Iran. Parasitol Res. 2015; 114(5):1907-12. [PMID]

[13] Memari F, Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Jonaydi Z. Isolation and molecular characterization of Acanthamoeba strains isolated from the oral cavity of immunosuppressed individuals in Tehran, Iran. Acta Parasitol. 2016; 61(3):451-5. [DOI:10.1515/ap-2016-0060] [PMID]

[14] Cabello-Vílchez AM, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Reyes-Batlle M, González AC, Guerra H, et al. Genotyping of potentially pathogenic Acanthamoeba strains isolated from nasal swabs of healthy individuals in Peru. Acta Trop. 2014; 130:7-10. [PMID]

[15] Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B. Acanthamoeba keratitis: An emerging disease gathering importance worldwide? Trends Parasitol. 2013; 29(4):181-7. [PMID]