

**Research Paper**

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



Roya Alasvand Javadi<sup>1</sup>, Mehdi Tavalla<sup>1</sup>, Molouk Beiromvand<sup>1</sup>, Samira Razzaghi<sup>2</sup>, \*Reza Arjmand<sup>3</sup>

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.



**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 Journal of Medical Sciences*. 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 amoebic 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](mailto:arjmand.reza@yahoo.com)

## Extended Abstract

### Introduction

**A**canthamoeba 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 Golesitan 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-nutritive 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

<i>Acanthamoeba</i> 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**  
**Journal of Medical Sciences**

**Table 2.** PCR specifications using JDP1 and JDP2 primers

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

**Jundishapur**  
**Journal of Medical Sciences**

**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**  
Journal of Medical Sciences

**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**  
Journal of Medical Sciences



**Jundishapur**  
Journal of Medical Sciences

**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  $\mu$ L of distilled water and 20  $\mu$ L of primer were added to two micro-tubes named as diluted G<sub>1</sub> and diluted G<sub>2</sub>.

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 $\pm$ 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 Jundishapur 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

## مقاله پژوهشی

## تعیین ژنوتایپ استرین های آکانتامبا جداشده از حلق و بینی افراد با نقص سیستم ایمنی

رویا علاسوند جوادی<sup>۱</sup>، مهدی تو لا<sup>۲</sup>، ملوک بیرم وند<sup>۳</sup>، سمیرا رزاقی<sup>۴</sup>، رضا ارجمند<sup>۵</sup>

۲. گروه انگل شناسی پژوهشی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۳. گروه انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۴. مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.



**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 Journal of Medical Sciences*. 2022; 21(4):460-473. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.4.2181>

**doi** <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.4.2181>



## جیکید®

**زمینه و هدف** آکانتامبا می تواند بیماری های انسانی و خیم از جمله کراتیت آمیبی و انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز را ایجاد کند که اکثر آ در افراد با نقص سیستم ایمنی دیده می شود. پژوهش حاضر به بررسی ژنوتایپ استرین های 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 نمونه گیری شد. پس از انتقال به آزمایشگاه گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز در محیط آگار پایه کشت داده شد و نمونه های مثبت جهت انجام آزمایش مولکولی استفاده شد.

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

**نتیجه گیری** نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که میزان آسودگی افراد با نقص سیستم ایمنی به انگل آکانتامبا در جمعیت مورد مطالعه بیش از سایر افراد است.

**کلیدواژه ها** آکانتامبا، آمیب آزاده، حفره های دهان و بینی، نقص ایمنی

تاریخ دریافت: ۲۵ مرداد ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: ۰۸ دی ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۱۰ مهر ۱۴۰۱

\* نویسنده مسئول:

رضا ارجمند

نشانی: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، پژوهشکده سلامت، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری.

تلفن: +۹۸ (۹۱۶) ۱۱۳۵۴۴۸

ایمیل: arjmand.reza@yahoo.com

## روشن برسی

این مطالعه توصیفی مقطعی و به مدت ۱۸ ماه انجام شد.  
جمعیت مورد مطالعه

نمونه های مورد آزمایش از مراجعان بیمارستان های 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 بیماری های زمینه ای 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 آن ها، اطلاعات جمعیت شناختی به صورت شفاهی دریافت و به وسیله پژوهشگر ثبت شد.

### روشن نمونه گیری

از هر بیمار یک نمونه با سوآپ استریل (از ترشحات حلق یا بینی، به صورت تصادفی) گرفته شد. این کار با استفاده از سوآپ های استریل و انتقال به محیط کشت انجام شد و نمونه ها جهت ادامه بررسی ها به آزمایشگاه گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز منتقل شدند.

### کشت نمونه

در آزمایشگاه دانشگاه، سوآپ آغشته به ترشحات بر روی محیط اگار پایه کشت داده شد. این محیط با استفاده از پودر باکتوآگار به صورت ۱/۵ درصد تهیه می شد و در پلیت های استریل یکبار مصرف ریخته می شد تا کاملاً بینند. پیش از بسته شدن محیط، به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو و در زیر هود در پلیت ها تقسیم می شد. دور پلیت ها با پارافیلم بسته شد و در یخچال با ۴ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

جهت تشخیص آکانتامبا، تمامی نمونه ها به صورت جداگانه در محیط کشت غیر مغذی باکتوآگار ۱/۵ درصد همراه با کشت کنه های از اشرشیاکلی، کشت داده شدند. سپس به محیط کشت، باکتری اضافه شد تا منبع غذایی خوبی برای آمیب تهیه شود. محیط ها در دمای اتاق انکوبه شدند. در روزهای دوم تا چهاردهم هر روز به مشاهده میکروسکوپی پرداخته شد تا نمونه مثبت از نظر آکانتامبا شناسایی شود. همه ایزو له های آمیبی مثبت، برای تولید کشت خالص به منظور استخراج DNA خالص می توان به روش ساب کالچرینگ<sup>۱</sup> کلون کرد و بدین منظور انگل های موجود به پلیت های جدید انتقال داده می شد.

### آزمایش ملکولی

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

## مقدمه

آکانتامبا یک آمیب فرصت طلب با زندگی آزاد است که در محیط های مختلفی مانند آب، خاک، گرد و غبار، استخر، فاصلاب، لنزهای چشمی و ظروف نگهدارنده لنز، آب معدنی داخل بطری، یونیت های دندان پژوهشی، دستگاه دیالیز، محیط های کشت، ترشحات گوش و بینی و مخاط حلق بیماران با ناراحتی های تفسی یافت می شود [۱]. این آمیب شایع ترین تک یاخته ای است که در محیط یافت می شود. همچنین آنتی بادی ضد آنتی زن های آکانتامبا در سرم بیش از ۸۰ درصد افراد با ایمنی کامل دیده شده که نشانگر تماس بالای انسان با این آمیب است [۲].

آکانتامبا می تواند بیماری های انسانی و خیم از جمله کراتیت آمیبی و بیماری نادر و کشنده انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز را ایجاد کند که اکثرًا در افراد با نقص سیستم ایمنی دیده می شود. زخم های پوستی و عفونت های نازو فارنشیال ناشی از این انگل نیز دیده شده است که بیشتر در افراد مبتلا به ایدز ایجاد می شود. امروزه براساس تعیین توالی زن RNA، جنس آکانتامبا به ۱۲ ژنو تیپ مختلف تقسیم می شود که با شماره های ۱ تا ۱۲ نام گذاری می شوند (T1-T12). در این تقسیم بندی تفاوت هر ژنو تیپ از ژنو تیپ دیگر ۵ درصد یا بیشتر است [۳]. بیشترین عفونت های آکانتامبایی انسان مر بوط به ژنو تیپ T4 است. در سال های اخیر، به دلیل افزایش شمار بیماری های نقص سیستم ایمنی مانند ایدز، هپاتیت و سرطان، بروز این عفونت ها افزایش یافته است [۴].

همچنین مطالعات نشان می دهند که کراتیت آمیبی در ایران و جهان به علت استفاده از لنزهای تماسی، رو به افزایش است. یکی از مواردی که می تواند در امر شناختن دقیق عوامل بیماری و سپس کنترل آن حائز اهمیت باشد، ژنوتایپینگ سویه های مختلف انگل است. ژنوتایپینگ شامل طیف وسیعی از برنامه های کاربردی مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل تفاوت های ژنتیکی بین افراد و یا سلول ها می باشد. این فرایند در تمام زمینه های مهم مطالعه علمی از جمله سرطان، پژوهشی قانونی و تحقیقات کشاورزی استفاده می شود [۵]. همچنین ژنوتایپینگ آکانتامبا یک ابزار مفید جهت مطالعه تاکسونومیک و روابط اپیدمیولوژیک است. درنتیجه اجازه می دهد روابط میان ایزو له های عفونتزا و فونوتیپ بیماری مثل فاکتور های بیماری زایی، حساسیت دارویی و غیره توضیح داده شوند [۶]. از آن جا که استرین های مختلف، قدرت بیماری زایی متفاوتی از خود نشان می دهند، تعیین استرین با قدرت بیماری زایی بیشتر، اهمیت درمانی بیشتری خواهد داشت.

مطالعات بیشتری برای شناسایی خصوصیات بیماری زایی و مارکرهای ژنتیکی جهت روش شدن این امر ضروری است. پژوهش حاضر جهت تعیین ژنوتایپ استرین های آکانتامبا جداسده از حلق و بینی افراد با نقص سیستم ایمنی انجام شد.

1. Sub-culturing

۲۵ میکرولیتر انجام شد. پس از یک سانتریفیوژ کوتاه، محلول واکنش PCR در ترموسایکلر قرار داده شد ([جدول شماره ۱](#)). **جدول شماره ۲** پرایمرهای مورد استفاده واکنش PCR را برای ژن TS1 از این مطالعه نشان می‌دهد. جهت شروع PCR بنا به میزان در نظر گرفته شده که در این مطالعه به شرح [جدول شماره ۳](#) بود، مقادیر مربوطه اضافه شد.

### سکونسینگ

به منظور تعیین ژنتایپ اکانتامباهاي جدا شده از بيماران، محصول PCR در نهايىت تعیين توالي و اطلاعات مربوط به توالي قطعه مربوط به هر نمونه با اطلاعات موجود در بانک ژن مقاييسه شد و ژنتایپ آميib تعیين مى شد.

### آزمون های آماری

برای تحلیل داده ها از نسخه ۲۳ نرم افزار SPSS استفاده شد و به منظور ارتباط سنجی پارامترهای مختلف از آزمون کای دو پاکای اسکوئر<sup>۷</sup> یا آزمون دقیق فیشر<sup>۸</sup> با سطح معناداری <۰.۰۵ استفاده شد.

- 7. Chi Square
- 8. Fishers exact test

جدا شد. جدا کردن نمونه جهت استخراج روی سطح پلیت چند سی سی محلول PBS ریخته می شد و با اسکریپر<sup>۳</sup> سطح پلیت با محلول بافر توسط سمپلر<sup>۴</sup> به میکروتیوب انتقال داده می شد و سپس سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ و زمان ۵ دقیقه رسوب حاصل جهت مراحل بعدی جدا شد. مراحل استخراج مطابق با بروشور کیت جینت بایو<sup>۵</sup> (کره جنوبی GeNet Bio) انجام شد. محصول استخراج در واکنش زنجیرهای پلیمراز<sup>۶</sup> استفاده شد. از پرایمرهای JDP1 و JDP2 جهت تکثیر ناحیه S1 ASA کامل ژن 18S rRNA ۱۸۰۰-۴۲۰ bp استفاده شد [\[۶\]](#).

جهت تعیین ژنتایپ نمونه موردنظر، 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<sup>۶</sup> (سینا کلون، ایران) آماده شود. در این مطالعه، PCR در حجم

- 2. Scraper
- 3. Sampler
- 4. GeNet Bio
- 5. PCR: Polymerase Chain Reaction
- 6. Master Mix

جدول ۱. برنامه زمانی PCR با پرایمرهای JDP1 و JDP2

مراحل	دوجه (°C)	زمان	چرخه
ذوب اولیه	۹۴	۲ دقیقه	۱
ذوب	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
	۵۰	۳۰ ثانیه	
	۷۲	۳۰ ثانیه	
اتصال			
طويل سازی			
طويل سازی نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

### جندي شاپور

جدول ۲. پرایمها جهت استفاده در این مطالعه

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

### جندي شاپور

جدول ۳. مقادیر مورد نیاز جهت شروع PCR

مستر میکس	پرایمر رقیق شده G <sub>1</sub> (F)	پرایمر رقیق شده G <sub>2</sub> (R)	DNA	D.W
۱۲۵ میکرولیتر	۲ میکرولیتر	۲ میکرولیتر	۷ میکرولیتر	۱/۵ میکرولیتر

### جندي شاپور

مجله علمی پژوهشی  
**جندي شاپور**

جدول ۴. فراوانی افراد مورد مطالعه بر حسب جنسیت

جنسیت	تعداد (درصد)
مرد	۱۱۰(۶۱/۵)
زن	۵۹(۳۸/۵)
جمع	۱۷۹(۱۰۰)

مجله علمی پژوهشی  
**جندي شاپور**

جدول ۵. فراوانی افراد مورد مطالعه بر حسب سن

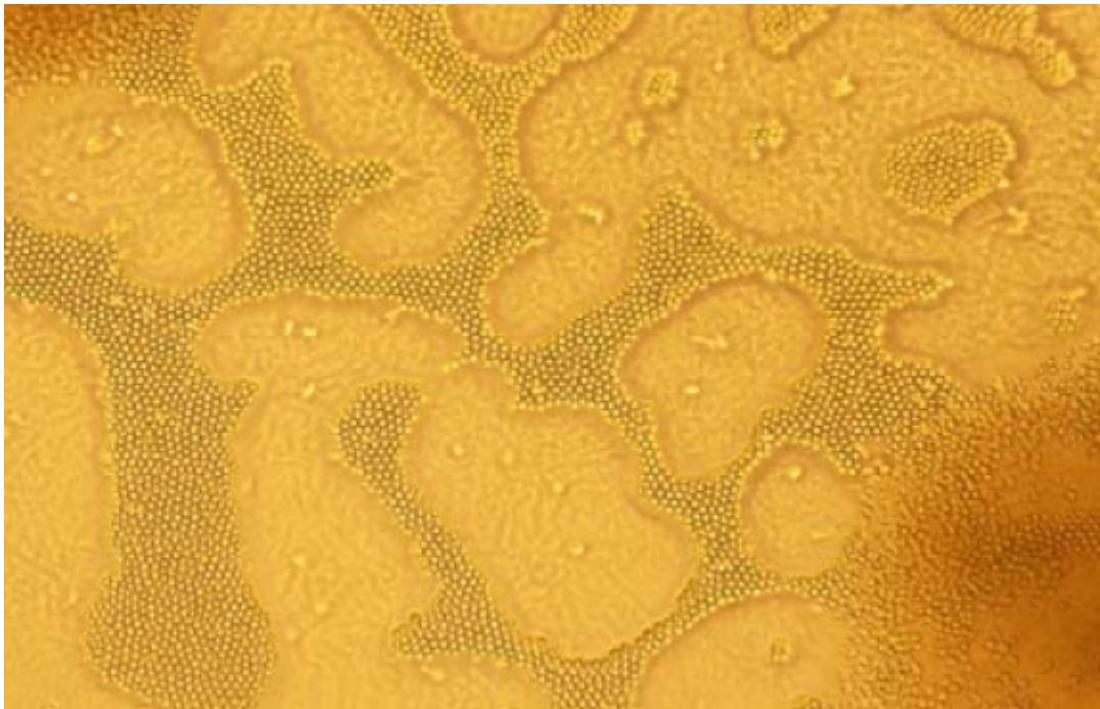
سن	تعداد (درصد)
۳۰-۲۰	۳۰(۱۶/۸)
۴۰-۳۰	۲۲(۱۲/۳)
۵۰-۴۰	۴۰(۲۲/۳)
۶۰-۵۰	۳۹(۲۱/۸)
۶۹-۶۰	۴۸(۲۶/۸)
جمع	۱۷۹(۱۰۰/۰)

مجله علمی پژوهشی  
**جندي شاپور**

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

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

مجله علمی پژوهشی  
**جندي شاپور**

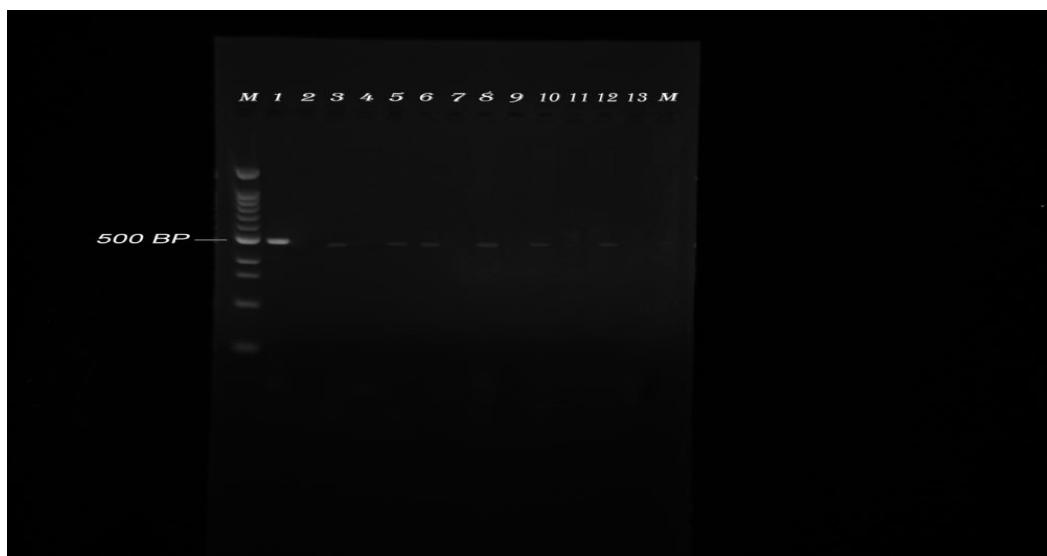
محله علمی پژوهشی  
جندي شاپور

تصویر ۱. کیست ستاره شکل در محیط آگار غیر مذذب حاوی باکتری اشرشیای کشته شده، بزرگنمایی ۴۰

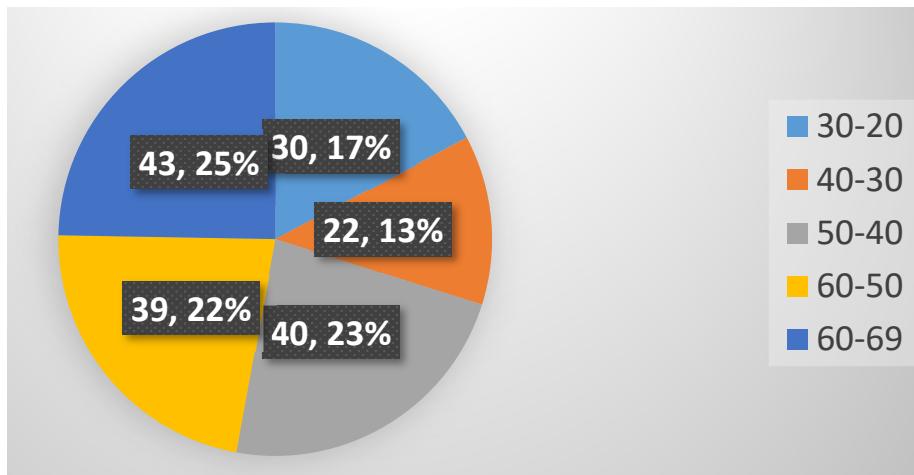
همان طور که در **جدول شماره ۴** نشان داده شده است، در مطالعه حاضر ۱۱۰ مرد و ۶۹ زن مورد بررسی قرار گرفتند. براساس اطلاعات تصویر شماره ۳ و جدول شماره ۵ بیشترین افراد شرکت کننده در گروه سنی ۶۹-۶۰ سال و میانگین سن افراد مورد بررسی ۴۸ سال با انحراف معیار ۱۲ می باشد.

#### یافته ها

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

محله علمی پژوهشی  
جندي شاپور

تصویر ۲. مشاهده باند ۵۰۰ BP آکانتامبا بر روی ژل آگاروز: M: سایز مارکر؛ ۱: کنترل مثبت؛ ۲: کنترل منفی؛ ۳-۱۲: نمونه های بیماران

مجله علمی پژوهشی  
جندي شاپور

تصویر ۳. فراوانی افراد مورد مطالعه بر حسب سن

زنوتایپ مختلف برای آکانتامبا شناسایی شده است که ژنوتایپ T4 شایع ترین ژنوتایپ و ژنوتایپ غالب در گیر در عفونت‌های کراتیت آکانتامبا است. زنوتاپینگ آکانتامبا یک ابزار مفید جهت مطالعه تاکسونومیک و روابط اپیدمیولوژیک است. در نتیجه اجازه می‌دهد روابط میان ایزوله‌های عفونت‌زا و فنوتایپ 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 کیسته‌های این انگل از این طریق وارد بدن انسان می‌شوند. بدلیل انتشار فراوان انگل آکانتامبا در آب، هوا و خاک در اطراف انسان، ورود آن‌ها به بدن انسان غیرمنتظره نیست. همچنین این آمیب یک انگل فرصت‌طلب نیز محسوب می‌شود، زیرا اکثر مواد خطرناک آن از بیمارانی با اختلال سیستم ایمنی مانند افراد دریافت‌کننده عضو (پیوند عضو) و بیماران مبتلا به ایدز گزارش شده است [۱۰].

از آنجاکه 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

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 در مورد 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).

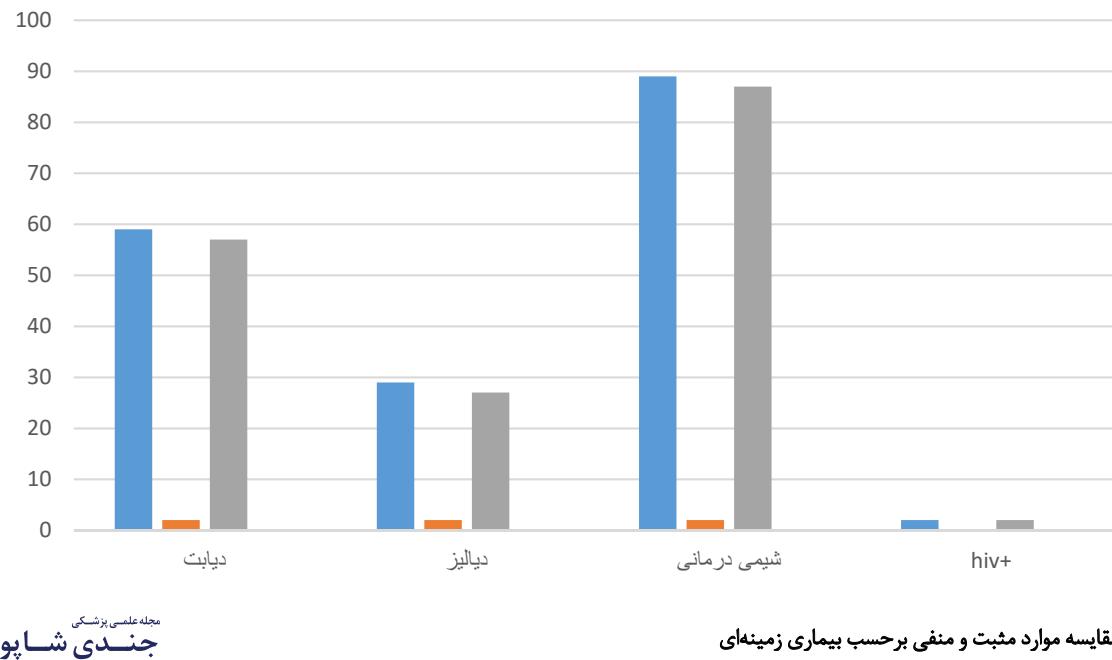
## بحث

آمیب آکانتامبا می‌تواند بیماری‌های انسانی و خیم از جمله کراتیت آمیبی و بیماری نادر و کشنده انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز را ایجاد کند. خزم‌های پوستی و عفونت‌های نازو فارنشیال ناشی از این انگل نیز دیده شده است که بیشتر در افراد ایدزی ایجاد می‌شود. پروگنوز آن به شدت ضعیف است و نیاز به تشخیص سریع و درمان موفقیت‌آمیز دارد [۸]. امروزه بالغ بر ۲۰

	DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	*	*
1. S1.Ahvaz	A T A G G G A T A G T T G G G G C A T T A A T A T T T A A T T G T C A G A G G T	
2. S2.Ahvaz	A T A G G G A T A G T T G G G G C A T T A A T A T T T A A T T G T C A G A G G T	
3. S3.Ahvaz	A T A G G G A T A G T T G G G G G C A T T A A T A T T T A A T T G T C A G A G G T	
4. S4.Ahvaz	A T A G G G A T A G T T G G G G G C A T T A A T A T T T A A T T G T C A G A G G T	
5. S5.Ahvaz	A T A G G G A T A G T T G G G G G C A T T A A T A T T T A A T T G T C A G A G G T	
6. S6.Ahvaz	A T A G G G A T A G T T G G G G G C A T T A A T A T T T A A T T G T C A G A G G T	
7. Acanthamoeba_T4_isolate.	A T A G G G A T A G T T G G G G G C A T T A A T A T T T A A T T G T C A G A G G T	

مجله علمی پژوهشی  
جندي شاپور

تصویر ۴. نتیجه تعیین توالی نمونه‌های مثبت



تصویر ۵. مقایسه موارد مثبت و منفی بر حسب بیماری زمینه‌ای

بالاست که مشابه نتایج مطالعه حاضر است که نشان داد تمام ۶ سویه شناسایی شده متعلق به ژنوتیپ T4 هستند [۱۲].

در مطالعه‌های در این زمینه در کشور پرو نشان داده شد که از ۷۶ نمونه سواب بینی از افراد سالم، ۲۱ نفر (۴/۲۸ درصد) از نظر آکانتاموبا مثبت بودند، ژنوتیپ‌های T4 و T15 شناسایی شد [۱۳]. با وجود این، مطالعات قبلی گزارش داده‌اند که فراوانی بالای ژنوتیپ T4 ممکن است به دلیل حدت بیشتر آن باشد که مطابق با مطالعه فعلی و قبلی است [۱۴، ۱۲، ۱۵].

### نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که میزان آلودگی افراد با نقص سیستم ایمنی به انگل آکانتاموبا در جمعیت مورد مطالعه به میزان ۳/۴ درصد است. همچنین تمام نمونه‌های مثبت با ژنوتیپ 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.

دارند، بخشی از جمعیت هستند که می‌توانند به عنوان افراد پرخطر در نظر گرفته شوند. از این رواهیت یافتن گونه‌های بالقوه بیماری‌زای آکانتاموبا در بیماران دارای نقص ایمنی بسیار بالا است. در این مطالعه آزمایش-کنترل به بررسی میزان آلودگی نمونه‌های به دست آمده از ترشحات دهان و بینی بیماران با نقص سیستم ایمنی به این انگل و تعیین ژنوتیپ 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)، به طوری که از کل نمونه‌های مورد بررسی نتایج PCR، در مجموع ۶ نمونه (۳/۴) مثبت شد که در مقایسه 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 پاتوزن آکانتاموبا از منابع غبار و بیوفیلم در بیمارستان‌های مختلف گزارش کرده‌اند [۱۱، ۷].

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 آکانتاموبا را در افراد دچار سرطان و اختلالات ایمنی به ترتیب ۴۵ و ۱۳/۴ درصد گزارش کرده‌اند [۱۳، ۱۲]. بررسی سواب‌های بینی جمع‌آوری شده از بیماران سلطانی در ایران، نشانگر وجود ژنوتیپ‌های T3، T4 و T5 در این منابع است، نتایج به دست آمده نشان داد که ۹ سویه جدادشده متعلق به ژنوتیپ T4 آکانتاموبا با پتانسیل بیماری‌زایی

## حامي مالي

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رویا علاسوند جوادی با شماره طرح OG-9828 در دانشگاه علوم پژوهشی جندی شاپور اهواز است. این پژوهش هیچ گونه کمک مالی از سازمانی های دولتی، خصوصی و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

## مشارك نويسندگان

مفهوم سازی: رضا ارجمند و مهدی تولا؛ تحقیق و بررسی: رویا علاسوند جوادی، رضا ارجمند و سمیرا رزاقی؛ نگارش پیش نویس اصلی: رویا علاسوند جوادی و رضا ارجمند؛ نگارش، نقد و پردازش: رضا ارجمند، مهدی تولا و ملوک بیرموند؛ سرپرستی: رضا ارجمند، مهدی تولا و ملوک بیرموند؛ روش شناسی: همه نویسندها.

## تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندها، این مقاله تعارض منافع ندارد.

## تشکر و قدردانی

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

## 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 mauritanensis 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 jacobsii 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, Haghghi 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, Lumbreiras-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, Hajihosseini 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, Haghghi 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, Haghghi 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-Batle 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. [\[PMID\]](#)