

جداسازی آمیب های آزاد زی بیماریزا (نگلریا و آکانتاموبا) از آب و خاک حاشیه رودخانه ها و دریاچه های مناطق مختلف کازرون

دکتر مصطفی رضائیان^۱، فریدون باقری^۱، شهره فرنی^۱ و زهرا بابایی^۱

چکیده:

در عملیاتی که روی آب و خاک در منطقه کازرون طی دو سال از ۱۳۷۸ الی ۱۳۸۰ به عمل آمد، مجموعاً ۳۵۴ نمونه آب و خاک از رودخانه ها و دریاچه پریشان تهیه گردید که ۱۰ مورد آمیب آکانتاموبا و ۳ مورد نگلریا جداسازی شد این موارد مثبت براساس نمونه گیریهای متعدد که در فصول مختلف سال و در شرایط اکولوژیک متفاوت به عمل آمد، حاصل گردید. نمونه های آبی با روشهای فیلتراسیون و عبور از صافیها برای جداسازی میکروارگانسیمها و با کمک سانتریفوژ آماده شد و سدیمانهای حاصله با مشاهده در زیر میکروسکوپ با بزرگ نمایی ۱۰ و ۴۰ و کشت در محیطهای آگار غیر مغذی که توسط اشرشیاکلی تقویت می گردید مورد بررسی قرار گرفتند. ضمن این بررسی یک مورد کراتیت آمیبی ناشی از آکانتاموبا در بین بیماران چشمی نیز جدا و مورد شناسایی قرار گرفت، بیمار دختری ۲۲ ساله و ساکن شهرستان کازرون می باشد که جهت درمان به پزشک معالج معرفی شد.

واژگان کلیدی: نگلریا، آکانتاموبا، آب و خاک، کراتیت آمیبی، ایران

^۱ گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵

مقدمه :

در بین تک یاخته هایی که زندگی آزاد دارند و در آب و خاک به سر می برند انواعی هستند که از نظر پزشکی اهمیت زیادی دارند و در سالهای اخیر با توجه به پیشرفتهایی که در روشهای تشخیص و آزمایشگاهی آنها حاصل گردیده است موارد گزارش شده رو به افزایش نهاده است (Markel E.K. 1996 and Martinez A.J. 1985). این گونه تک یاخته ها را در اصطلاح بیولوژیکی آمفی زوئیک می گویند چون ضمن اینکه زندگی آزاد دارند می توانند به طور اتفاقی به انسان نیز منتقل شوند. این تک یاخته ها با این که در سیر زندگی خود اصولاً هیچ مرحله انگلی ندارند ولی وقتی به طور اتفاقی وارد بدن انسان می شوند، در آنجا مستقر شده و تاثیر نموده و ناهنجاریهایی را برای حیوان یا انسان ایجاد می نمایند (رضائیان و دیباجی ۱۹۷۵). در جنس نگلریا گونه مهم نگلریا فاولری مورد توجه است که در آبها بسر می برد. تک یاخته در هنگام شنا وارد مجرای بینی انسان شده از استخوان غربالی شکل می گذرد و خود را به پیاز بویایی می رساند و از طریق پیاز بویایی در سطح مغز مستقر گردیده و ایجاد لزیونهای پیشرونده می نماید (Markel E.K. 1996, McGill R.J. et al. 1967, page F.C. 1974). بدین ترتیب ایجاد بیماری کشنده و حادی به نام مننگوآنسفالیت اولیه آمیبی یا (Primary Amebic Meningoencephalitis) PAM می نماید (Markel E.K. 1996) و رضائیان (۱۳۷۵). این بیماری سیری کوتاه دارد و در مدت کوتاهی قربانی را به کام مرگ می کشد. جنس آکانتامبا شامل گونه های متعددی است. این گونه ها در آب و خاک به سر می برند و تروفوزوئیت های آنها در انسان و حیوانات از همان مسیر فوق الذکر وارد مغز شده و ایجاد بیماری مزمن با سیر طولانی تر و مرگباری را بنام آنسفالیت گرانولومایی آمیبی یا

(Granulomatous Amebic Encephalitis) GAE می نماید. از طرفی دیگر با توجه به مقاومت زیادی که گونه های این جنس در مقابل خشکی و غیره از خود نشان می دهند، قادرند بر روی زخمها و خراشهای پوستی به خصوص خراشهای قرنیه ای، مستقر گشته پس از رشد و تکثیر ایجاد کراتیت های آمیبی بنمایند (Markel E.K. 1996, Martinez A.J. 1985). این زخمها در قرنیه انسان باعث تیره شدن قرنیه و از بین رفتن آن می شود که در صورت عدم درمان موجب کوری می گردد (Markel E.K. 1996, Volker K. et al. 1981). هدف از این مطالعه شناسایی این عوامل در آب و خاکهای حاشیه رودخانه و دریاچه های منطقه بود که با توجه به گرم بودن منطقه و عادت مردم به شنا موارد انسانی آن نیز مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها :

الف) نمونه گیری: نمونه گیری در چهار فصل سال (بهار، تابستان، پاییز و زمستان) به عمل آمد. نمونه ها براساس تجربه های قبلی بیشتر در گرمترین ساعات روز به وسیله یک بطری دسته دار از آب مورد نظر جمع آوری می گردید.

به طور کلی چهار نوع نمونه گیری به عمل آمد، از سطح آب، از عمق نیم متری آب، از رسوبات کف دریاچه، از خاک مرطوب ساحل. درجه حرارت آب در نقاط مختلف با یک ترمومتر اندازه گیری شده و یادداشت می گردید.

ب) جداسازی آمیب ها: نمونه های آب و رسوب بلافاصله به آزمایشگاه منتقل می گردید و مورد بررسی قرار می گرفت. نمونه توسط یک فیلتر کاغذی با منافذی به ابعاد یک میکرومتر عبور داده می شد. محتویات روی فیلتر ابتدا با میکروسکوپ نوری با عدسیهای ۱۰ و ۴۰ مورد

می کرد. در رابطه با موارد انسانی قبلا نیز یک مورد در کنگره بیماریهای گرمسیری در ژاپن، سال ۱۹۹۶ گزارش شده و طبق اظهارات شفاهی دکتر رضائیان موارد متعددی نیز در آزمایشگاه تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت در بیماران مبتلا به کراتیت تشخیص داده شده است (Rezaian M. 1996).

در بررسی از رودخانه ها، معمولا نمونه هایی که از قسمتهای جاری آب گرفته شده بودند نمونه های زیاد مناسبی نبودند و عملا هیچ کدام از این نمونه ها مثبت نشدند بلکه بیشتر سعی در گرفتن نمونه هایی که از قسمتهای ساکن در بخشهایی از رودخانه ها که معمولا از زنجیره غذایی کاملی برخوردار بودند، داشتیم.

بحث:

به طور کلی در فصول سرد نمونه های رسوبات کف دریاچه نتایج بهتری را دارند. در فصل زمستان باتوجه به اینکه هوا سرد است این تک یاخته ها به صورت کیست درآمده و در کف جایگزین می شوند. با گرم شدن هوا کیستها به تروفوزوئتها تبدیل می گردند (Kwang W.J. 1973, Vivesvara G.S. 1975, Sawyer T.K. et al. 1977, Zsuxunna Z. et al. 1998). لذا نمونه های کف بیشتر حاوی کیست ها بوده اند. در حالی که تروفوزوئتها در کف مشاهده نمی شوند. این اشکال فعال باتوجه به این که بسیار نیازمند به اکسیژن هستند ترجیحا در سطح آب بیشتر موجودند و نمونه هایی که از اعماق مختلف دریاچه پریشان تهیه گردید، مویند این موضوع است. ما به منظور مطالعه اکولوژی این تک یاخته ها از نقاطی که از نظر آمفی زوئیک ها مثبت بوده اند. نمونه های متعدد از اعماق مختلف آب تهیه نمودیم ولی صرفا در سطح توانستیم این تک یاخته ها را بیابیم که با کار محققین دیگر همخوانی دارد (Huizinga W. et al. 1990, Dejonkeere J. et al. 1977)

آزمایش قرار می گرفت و سپس اشکال آمیبی مشاهده شده ترسیم و تشخیص داده می شد. تشخیص تک یاخته ها با توجه به کلید تشخیص تک یاخته های بازندگی آزاد پاترسون صورت پذیرفت (Patterson D.J. 1992).
ج) کشت: آنگاه باقیمانده رسوب روی فیلتر در محیطهای کشت اختصاصی شامل محیطهای نلسون (برای نگلریا) و کولیرتسون (برای آکانتامویا) کشت داده می شد و در صورت مثبت بودن مورد بررسی و تشخیص قرار می گرفت (Patterson D.J. 1992).

نتایج:

جمعا ۳۵۴ نمونه آب و خاک از رودخانه و دریاچه های پریشان و دشت ارژن تهیه گردید. نمونه ها در فصول مختلف سال تهیه شدند. به طوری که جمعا ۵۶ نمونه در بهار، ۸۲ نمونه در تابستان، ۱۳۵ نمونه در پاییز و ۸۱ نمونه در زمستان بودند (جدول ۱). در بین نمونه ها ۱۰ مورد آکانتامویا و ۳ مورد نگلریا جداسازی شد اشکال آنها ترسیم گردیدند و تشخیص نهایی پس از کشت دادن نمونه ها در محیطهای اختصاصی عملی گردید. موارد مثبت آکانتامویا از آب و خاک حاشیه رودخانه های اردشیری، تنگ چوگان، چشمه ساسان، شاهپور و نهر از دریاچه پریشان جهت قریه آب کنارون و دریاچه های پریشان و دشت ارژن بوده اند و موارد مثبت نگلریا از رودخانه های اردشیری، تنگ چوگان و دریاچه پریشان جدا شدند (جدول ۱).

در بررسی موارد انسانی فقط به یک مورد زخم قرنی چشم برخورد کردیم که بیمار خانم دانشجوی ۲۲ ساله ساکن شهر کازرون بود که باتوجه به ناراحتی و تاری چشم به چشم پزشک مراجعه نموده پس از تهیه تراشه و کشت در محیط آگار، غیر مغذی (کولیرتسون) آکانتامویا رشد و تکثیر نمود، در ضمن بیمار از لنز استفاده

گردید در فصل تابستان و در سطح آب و در ساعت ۴ بعدازظهر بود. مورد دوم نگلریا از رسوبات کف دریاچه در فصل زمستان دریافت شد که به صورت کیست بود. منطقه ای از دریاچه که ما تروژوئیت نگلریا و آکانتامو را جدا نمودیم منطقه ای با پوشش گیاهی در عمق آب، انواع خزه های آبی، انواع تکک یاخته ها و جلبکهای سبز فتوسنتز کننده بود. و این گویای این مطلب است که تکثیر فراوان و افزایش جمعیت این تکک یاخته ها وابسته به زنجیره غذایی غنی آب می باشد. هرچه این زنجیره غذایی به خصوص از نظر فتوسنتز کننده های تک سلولی غنی تر باشد اکوسیستم حاصله برای جمعیت تکک یاخته ای مناسب تر می شود (Wellinges F.M. et al. 1997, Lawandre R.V. et al. 1979, Klye D.E. et al. 1982). نمونه هایی را که به آزمایشگاه منتقل می گردیدند پس از بررسی میکروسکوپی به روشهایی مانند افزایش مواد غذایی، غنی نمودیم. پس از چندروز ملاحظه شد که انواع تکک یاخته ها که تعداد آنها قبلاً کم بودند، به شدت افزایش جمعیت یافتند و این کار نیز مجدداً تشخیص قبلی ما را تایید می کرد.

در بررسی از رودخانه ها معمولاً نمونه هایی که از قسمتهای جاری آب گرفته شده بودند نمونه های زیاد مناسبی نبودند و عملاً از هیچ کدام از این نمونه ها آمیب جدا نشد. بلکه بیشتر سعی داشتیم در نمونه هایی که از قسمتهای ساکن در بخشهایی از رودخانه ها که معمولاً از زنجیره غذایی کاملی برخوردار بودند نمونه گیری نماییم. در حواشی رودخانه ها گاهی قسمتی از آب به صورت یک مجموعه بسته درمی آید و جریان بسیار ضعیفی از آب از روی آن عبور می نماید. این مناطق معمولاً بهترین مکان برای مطالعه فون تکک یاخته ای است (Penas - Ares M. et al. 1993). چون نجیره غذایی کاملی دارد و تکک یاخته ها فرصت خوبی برای رشد

از طرفی این تکک یاخته ها ترموفیل (حرارت دوست) هستند و ترجیحاً در درجه حرارتهای بالا از جمعیت بیشتری برخوردارند. در ساعات گرم روز بین ساعت ۲ تا ۴ بعدازظهر که در اثر تابش خورشید آب سطح دریاچه گرم می گردد، احتمال یافتن آمیب نیز افزایش می یابد. ولینگز مواردی از نگلریا را در دریاچه های فلوریدا جداسازی نموده است و بیشترین سطوح آمینی را در ماههای گرم تابستان به خصوص در ساعات گرم بدست آورده است (Klye D.E. et al. 1982, Wellinges F.M. et al. 1997). به منظور بررسی این احتمال بعضاً در ساعات مختلف روز از صبح تا عصر که در درجه حرارت سطحی آب تفاوت چشمگیر وجود داشت نمونه گیری به عمل آوردیم، در واقع بهترین جوابهای ما از نظر جمعیتی تکک یاخته ها در گرمترین ساعات به دست می آمد که بررسیهای محققین مختلف موید این واقعیت است (Wellinges F.M. et al., 1977) و همچنین در اکثر بررسیها آمیب های آمفی زوئیک بیشتر در دریاچه ها یا استخرهای شنا و آبهای آلوده به پساب سیستم های صنعتی گزارش شده است (Huizinga W. et al. 1990, Wellinges F.M. et al. 1997).

در آبهای معمولی این آمیبها را کمتر گزارش می نمایند. به طور کلی آبهای با درجه حرارت بالا ممکن است به عنوان مخازنی قوی برای ادامه حیات همیشگی و انتشار آنها عمل نمایند و عملاً وقتی درجه حرارت از ۳۰ درجه سانتی گراد تجاوز می کند گونه ای نگلریا رشد و تکثیر بهتری می یابند (Wellinges F.M. et al. 1997, Dejenkheere J. et al. 1997). این موضوع در بررسیهای متعدد در یک نقطه خاص از دریاچه پریشان انجام شد. چون منطقه ای خاص از دریاچه پریشان را مورد نمونه برداری در فصول متفاوت و اعمال مختلف در نظر گرفتیم عملاً تنها مورد نگلریا که در این نقطه جدا

می تواند هشداری جهت همکاران شبکه بهداشت و درمان و پزشکان و پیراپزشکان منطقه باشد که احتمال بروز بیماریهای PAM و GAM را در منطقه بدهند و مردم را از خطر آلوده شدن هنگام شنا در آبهای آلوده آگاه نمایند و پزشکان بیماری ناشی از آمیبهای بازندگی آزاد را جدی بگیرند و موارد مشکوک را نیز مورد توجه قرار دهند.

تشکر و قدردانی:

- از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که بودجه لازم جهت اجرای این پروژه را در اختیار گذاشتند.
- از شبکه بهداشت و درمان شهرستان کازرون
- از مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی کازرون به پاس همکاریهای لازم.

و تکثیر خواهند داشت. مواردی از تروفوزوئیت ها را که از رودخانه های شاهپور و تنگ چوگان جداسازی شدند از این گونه نقاط بودند. حتی یک مورد کیست آکانتاموبا که از کف رودخانه برداشت شده بود از رسوبات کف همین قسمت از رودخانه بوده است. اسپرانیزا و مونیکا در چشمه های گالیسیا در اسپانیا نیز مواردی از نگلریا و آکانتاموبا را جدا نموده اند. آنها نیز عادات اکولوژیکی مشابهی را برای تک یاخته ها گزارش نموده اند. (Lawande R.V. et al. 1993, Panas-Ares M. et al. 1993).

در بررسی روی قسمتهایی از کف رودخانه ها و دریاچه ها که از نظر کیست این تک یاخته مثبت بودند، مشاهده شد که هیچ یک از آنها شنی نبوده بلکه اغلب از رسوبات کاملاً نرم پوشیده شده بود. بررسیهای دیگر نیز این موضوع را تایید می نماید (Dejinkeere J. et al. 1977). نتایج این بررسی

جدول ۱- فراوانی آمیبهای آکانتوموبا و نگلریای جدا شده در فصول مختلف سال و محل‌های نمونه برداری در منطقه کازرون

| محل‌های نمونه برداری | نوع آب | تعداد | | | | جمع نمونه | موارد مثبت | |
|---|--------|-------|---------|-------|--------|-----------|------------|--------|
| | | بهار | تابستان | پائیز | زمستان | | آکانتاموبا | نگلریا |
| چشمه چنار | شیرین | ۵ | ۱۲ | ۴ | ۱۸ | ۳۹ | ۰ | ۰ |
| نهر آبیاری از رودخانه شاهپور | شیرین | ۴ | ۳ | ۷ | ۲ | ۱۶ | ۰ | ۰ |
| رودخانه اردشیری | شیرین | ۵ | ۴ | ۶ | ۸ | ۲۳ | ۱ | ۱ |
| رودخانه تنگ چوگان | شیرین | ۴ | ۷ | ۱۱ | ۷ | ۲۹ | ۱ | ۱ |
| چشمه ساسان | شیرین | ۸ | ۱۴ | ۱۲ | ۲ | ۳۶ | ۱ | ۰ |
| رودخانه بلبک | شور | ۳ | ۵ | ۱۸ | ۱۴ | ۴۰ | ۰ | ۰ |
| رودخانه بالاده | شور | ۴ | ۸ | ۱۸ | ۱۲ | ۴۲ | ۰ | ۰ |
| دادین علیا | شیرین | ۳ | ۲ | ۱۱ | ۲ | ۱۸ | ۰ | ۰ |
| نهر از دریاچه پریشان جهت قریه آب کنارون | شیرین | ۱ | ۷ | ۱۴ | ۱ | ۲۳ | ۲ | ۰ |
| پل آبگینه | شیرین | ۱ | ۶ | ۲ | ۲ | ۱۱ | ۰ | ۰ |
| رودخانه شاهپور | شیرین | ۹ | ۷ | ۱۴ | ۲ | ۳۲ | ۲ | ۰ |
| دریاچه پریشان | شیرین | ۶ | ۴ | ۱۶ | ۵ | ۳۱ | ۲ | ۱ |
| دریاچه دشت ارژن | شیرین | ۱ | ۲ | ۱ | ۳ | ۷ | ۱ | ۰ |
| دریاچه خشت | شور | ۲ | ۱ | ۱ | ۳ | ۷ | ۰ | ۰ |
| جمع | | ۵۶ | ۸۲ | ۱۳۵ | ۸۱ | ۳۵۴ | ۱۰ | ۳ |

منابع :

- species of Hartmanella and three of vankampfia. *J. Protozool.* **24** : 499-521.
- Patterson D.J. (1992) free-living freshwater protozoa (color guide). UNSW press.
- Penas-Ares M., PaniGua-crespor E. (1993) Isolation of Free living pathogenic Ameoba. From thermal spas in N.W spain. *Water, Air and Soil Pollution.* **78**: 88-90.
- Rezaian M., Begaie N. (1996) A case report of Keratitis due acanthamoeba in Iran. XIV inter cong. *Trop. Medical and malaria in Japon.*
- Sawyer T.K., Vivesvara G.S., Herke B.A. (1977) Pathogenic Amoebae from brakish and ocean sediments. *Science.* **196**: 1324-1325,
- Visvesvara G.S., Jones Dan B., Nettie M. (1975) Robinson Isolation, identification and Biological Characterization of *Acanthamoeba polyphaga* from A human Eye, *Am.J. Tropical Medicine and hygiene.* **45**: 784-790.
- Volker – Dieben and Alphen K. (1981) A case of *acanthamoeba Reratitis* in the Netherlands. *Trans Royal Society Medicine and Hygiene.* **75**(1): 86-91.
- Wellinges F. M., Amuse P.T., Chang S.L. and Lewis A.L. (1997) Isolation and identification of pathogenic Naegleria from Florida Lakes . *APP Environ. Microbiol.* **34**(6): 661-667.
- Zsuxunna Z., Enelo T., Yagit A.K. and Nagy, E. (1998) Isolation, identification an increasing importance of Free-living amoebae causing human diseases. *J.Med. Microbiol.* **47**:5-16.
- رضائیان، مصطفی. دیباجی، رسول (۱۳۷۵). آمیبهای آزادزی، انتشارات دانشگاه تهران.
- Cursons Ray T.M., Brown TIM J., Keys E.A. (1980) Effect of Disenfectant on pathogenic free living Amoeba *APP, Environ Microbiology.* **40**(1):62-66.
- Dejonkheere J. and H.van de voorde (1977) The distribution of Neagleria fowleri in manmad thermal waters *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**:10-15.
- Huizinga Harry W. and Mclaughlin Gerald. L.M (1990) Thermal Ecology of Naegleria fowleri from a power plant cooling Reservoir. *APP Environ Micro biology.* **56**(7): 2200-2205.
- Klye D.E., Hoblet G.P. (1982) Seasonal distribution of thermotolerant free-living Amoebae. *J. Protozool.* **33**: 422-484.
- Kwang W.J. (1973) The biology of amoeba. Academic press, New York.
- Lawande R.V., Ogunkanmi A.E. and Egler L.J. (1979) Prevalence of pathogenic free-living amoeba in Zaria, Nigeria, *Annals of Tropical Medicine and parasitology.* **73**(1): 51-56.
- Markell E.K. (1996) Medical parasitology. Saunders. Co. London.
- Martinez A.J. (1985) free living amoeba. CRC press, London.
- McGill Barie R.J., MCG steels A.D. (1974) Amoebic infection of the eye . *Lancet.* **28**:1535-1539.
- Page F.C. (1967) Taxonomic criteria for *Limax amoeba* with descriptions of three new

ISOLATION OF PATHOGENIC AMOEBAS (NAEGLERIA AND ACANTHAMOEBA) FROM WATER SOURCES AND MARGIN SOILS OF RESERVOIRS AND LAKES IN KAZERUN

Rezaian. M.,¹ PhD; Bagheri F.,¹ MSPH; Farnia Sh.,¹ Babai Z.,¹ MSPH

In a survey from 1999 to 2001, a total of 354 samples of soil and water were collected from different areas and examined for the presence of Acanthamoeba and Naegleria spp. After sieving, filtration and centrifugation, samples were examined for the free living protozoa (amphyzoic amoeba). Concurrently, a sediment of each sample was cultured in the non-nutrient agar medium enriched by E.coli. In the end, 10 Acanthamoeba spp. and 3 Naegleria sp. were isolated. Besides, we diagnosed one case of human Acanthamoeba infection in a person residing in the area.

Key words: *Naegleria, Acanthamoeba, water and soil, amphyzoic amoeba, Iran*

¹Department of Parasitology, School of Public Health & Institute of Public Health, Tehran University of Medical Sciences. P.O.Box. 6446-14155, Tehran, Iran.