

# Frequency survey of free-living amoebae isolated from improved hot springs of Mazandaran Province, 2014

Alireza Latifi<sup>1,2</sup>, Maryam Niyiyati<sup>1,2\*</sup>, Naser Valayi<sup>3</sup>, Zohreh Lasjerdi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Molecular and Cellular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup> School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received 5 Feb, 2015 Accepted 18 Mar, 2015)

## Abstract

**Background:** Free-living amoebae, which are called as amphizoic amoebae, could live in various environmental sources such as water, soil, dust and also human and animal tissues. According to possible contamination of hot springs to free living amoebae and developing related disease such as keratitis and encephalitis in people at risk and the lack of knowledge regarding their distribution in hot springs of Mazandaran province, the preset study was conducted in 2014.

**Methods:** In this discretional study, samples were taken from 22 hot springs in Mazandaran province. Three samples with 500 ml volume were taken in sterile bottles and transferred to laboratory of Shahid Beheshti University of Medical Sciences. Based on culture and morphological criteria, hot springs contamination to free living amoebae was surveyed.

**Results:** Out of 22 hot springs in Mazandaran province, 17 (77.27%) springs were contaminated to free living amoebae. The most prevalent amoebae were *Vermamoebae* (50%) following with *Vahlkampfiids* (45.45%), *Acanthamoeba* (40.9%), *Vannella* (9.09%) and *platyamoebae* (4.54%).

**Conclusion:** It seems hot springs contamination to free living amoebae is relevant and this could be a health hazard for endemic people, tourists and travelers who use these hot springs. To this end, researches with purpose of decreasing the diseases due to free living amoebae in hot springs of Mazandaran province and other hot springs in the region are important priorities and also posting of alarming signs along the hot spring are recommended for awareness of people at risk.

**Key words:** Free living, Hot springs, *Acanthamoeba*, *Vermamoebae*, *Vahlkampfiids*, Mazandaran province

## بررسی فراوانی آمیب‌های آزادزی در چشمه‌های آب گرم بهسازی شده استان مازندران در سال ۱۳۹۳

علیرضا لطیفی<sup>۱،۲</sup>، مریم نیتی\*<sup>۱،۲</sup>، ناصر ولایی<sup>۳</sup>، زهره لاسجردی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی  
<sup>۲</sup> گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی  
<sup>۳</sup> دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

### چکیده

**سابقه و هدف:** آمیب‌های آزادزی که به نام آمیب‌های آمفی زوئیک یا دوگانه زی معروف هستند، توانایی زیست در منابع محیطی مختلف از جمله آب، خاک، گرد و غبار و همچنین بافت‌های بدن انسان و حیوان را دارند. با توجه به نگرانی آلودگی چشمه‌های آب گرم از نظر وجود آمیب‌های آزادزی و بیماری‌های متعاقب این آمیب‌ها از جمله کراتیت و انسفالیت آمیبی در افراد مستعد آلودگی و عدم وجود اطلاعات دقیقی در مورد وضعیت آن‌ها در چشمه‌های آب گرم استان‌های ایران از جمله استان مازندران این تحقیق در پاییز سال ۱۳۹۳ انجام گرفت.

**روش بررسی:** در این مطالعه مقطعی، از تمام چشمه‌های آب گرم بهسازی شده استان مازندران که تعداد آنها ۲۲ عدد برآورد گردید، سه نمونه به حجم ۵۰۰ میلی لیتر در ظروف استریل تهیه و به آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل گردید. سپس بر اساس روش‌های کشت و مورفولوژی آمیب‌ها، آلودگی چشمه‌ها از نظر وجود آمیب‌های آزادزی و انواع آنها مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** از ۲۲ چشمه آب گرم بهسازی شده استان مازندران، ۱۷ (۷۷/۲۷٪) چشمه به آمیب‌های آزادزی آلوده بودند. شایع‌ترین آمیب، ورمی آمبا (۵۰٪) و پس از آن به ترتیب والکامفیده (۴۵/۴۵٪)، آکانتامبا (۴۰/۹٪)، ونلا (۹/۰۹٪) و پلنتی آمبا (۴/۵۴٪) بودند.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تعداد چشمه‌های آلوده به آمیب‌های آزادزی قابل توجه بوده و نگرانی را برای افراد محلی، توریست‌ها، گردشگران و مسافران که از این چشمه‌ها استفاده می‌نمایند به وجود می‌آورد. به همین منظور انجام تحقیقات مداخله‌ای برای کاهش آلودگی بیماری‌های مرتبط با آمیب‌های آزادزی در چشمه‌های آب گرم استان مازندران و سایر چشمه‌های آب گرم کشورمان را امری ضروری دانسته و نصب علائم هشدار دهنده در کنار چشمه‌های آب گرم جهت توجه افراد در معرض خطر و همچنین سایر افراد، توصیه می‌نماییم.

**واژگان کلیدی:** آمیب‌های آزادزی، چشمه‌های آب گرم، آکانتامبا، ورمی آمبا، والکامفیده، استان مازندران.

### مقدمه

آمیب‌های آزادزی که به نام آمیب‌های آمفی زوئیک یا دوگانه زی معروف هستند، توانایی زیست در منابع محیطی مختلف از جمله آب، خاک، گرد و غبار و همچنین بافت‌های بدن انسان و حیوان را دارند (۱). عفونت‌های ناشی از آمیب‌های آزادزی بسیار وخیم‌تر

از عفونت‌های انگل‌های متداول بروز می‌کنند. در واقع، این عفونت‌ها می‌توانند منجر به عوارض بسیار وخیم و حتی مرگ در بیماران شوند (۲). از راه‌های ورود این آمیب‌ها به بدن می‌توان به خراش‌های پوستی، ورود از طریق مسیر بویایی در اثر شیرجه زدن در آب چشمه‌ها و نیز لنزهای تماسی که در تماس با آب این چشمه‌ها قرار گرفته‌اند اشاره نمود (۳، ۲). افزایش روز افزون افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی از جمله ایدز و افراد تحت درمان با کورتیکواستروئیدها و یا افراد تحت درمان کموتراپی منجر به افزایش خطر ابتلا افراد به آمیب‌های آزادزی پاتوژن می‌شود (۵)

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دکتر مریم نیتی (e-mail: maryamniyati@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۱۶

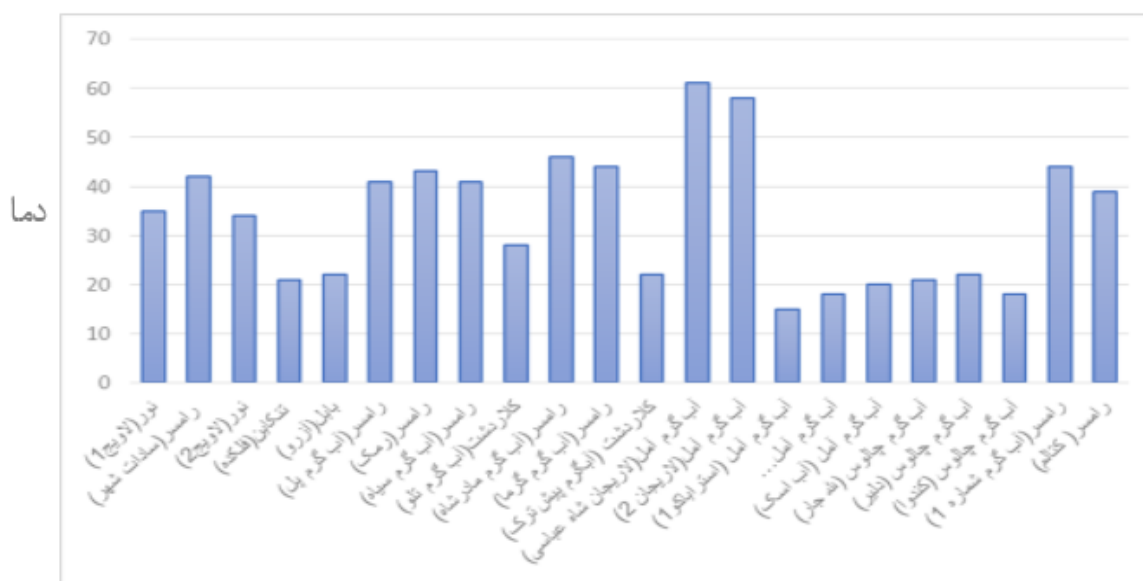
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۲۷

ایران و توجه به این نکته که اکثر بیماران مبتلا به آمیب های آزادزی پاتوژن سابقه تماس با منابع آبی آلوده و گاهی آب های گرم را در تاریخچه خود ذکر می کنند (۱،۳،۲). این تحقیق در خصوص چشمه های آب گرم استان مازندران از لحاظ آلودگی به آمیب های آزادزی در پاییز ۱۳۹۳ صورت گرفت. همچنین به دلیل ظرفیت بالای گردشگری و توریستی و استقبال مردم از این استان و چشمه های آب گرم آن، استان مذکور انتخاب گردید. لازم به ذکر است به غیر از مواردی اندک، سایر چشمه های آب گرم ایران از نظر آلودگی به آمیب های آزادزی پاتوژن مورد بررسی و توجه قرار نگرفته اند. با توجه به عوارض و بیماری های شناخته شده آمیب های آزادزی، مطالعه و بررسی این چشمه ها امری ضروری به شمار می رود.

### مواد و روشها

این تحقیق به روش cross-sectional (مطالعه مقطعی) انجام گرفت. ابتدا محل دقیق چشمه های آب گرم استان بر اساس اطلاعات به دست آمده از سازمان آب و فاضلاب استان مازندران و سازمان های آب منطقه ای استان و همچنین سازمان حفاظت از محیط زیست و گردشگری استان مازندران تعیین گردید که تعداد این چشمه ها ۲۲ عدد برآورد شد. با حضور در محل چشمه های آب گرم استان، سه نمونه به حجم ۵۰۰ میلی لیتر در ظروف استریل از محل های مختلف چشمه ها تهیه و همچنین دمای چشمه ها از طریق دماسنج تعیین شد (نمودار ۱). میزان اسیدیته و قلیایی بودن هر چشمه بر اساس اطلاعات ثبت شده توسط مسئولین این چشمه ها جمع آوری گردید (جدول ۱). به فاصله دو روز نمونه های جمع آوری شده به آزمایشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل شدند. از هر ظرف نمونه به میزان ۲۵۰ میلی لیتر از آب تهیه شده از فیلتر نیترو سلولزی ۱/۲ میکرون عبور داده شد. سپس فیلترها در محیط کشت باکتو آگار ۱ درصد که ترکیبی از پودر باکتو آگار شرکت دیفکو و آب مقطر بود و توسط اتوکلاو استریل شده بود قرار داده شدند. برای رشد بهتر آمیب ها قبل از قرار دادن فیلتر به محیط کشت، مقداری از سوسپانسون باکتری اشرشیا کلای تهیه و به محیط اضافه گردید. سپس اطراف پلیت ها برای محافظت آمیب ها و جلوگیری از تبخیر شدن محیط کشت با پارافیلیم پوشانده و پلیت ها در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. به فاصله دو روز بعد با میکروسکپ نوری بر اساس ویژگی های مورفولوژی و کلید Page به بررسی پلیت ها پرداخته شد (۱). پلیت ها به

۴. چشمه های آب گرم از دیرباز تاکنون مورد توجه مردم بوده است و در کتب و متون قدیمی به ارزش و اهمیت این نوع آب ها برای درمان بیماری های جلدی و مفصلی اشاره شده است. از آنجایی که مکان زیست آمیب های مذکور منابع آبی به خصوص آب هایی با درجه بالای دمایی می باشد، لذا افزایش استفاده مردم از منابع آبی از جمله استخرهای آب گرم، وان های آب گرم، دریاچه ها و آب های معدنی گرم منجر به افزایش خطر ابتلا به عفونت های ناشی از آمیب های آزادزی شده است (۵،۶). در واقع، مدت های مدیدی است که از چشمه های آب گرم به منظور درمان بیماری های مختلف از قبیل التهاب مزمن دستگاه تنفسی فوقانی و بیماری های چشمی در کشور های مختلف استفاده می شود (۶). درمان با آب های معدنی جهت بهبود آرتروز و تعداد وسیعی از آسیب های ورزشی نیز توصیه می گردد (۷). از آنجایی که بیشتر جنس های آمیب های آزادزی از جمله آکانتامباها، والکامفیده ها و ورمی امباها قادر به تحمل دماهای بالا و زنده ماندن در محیط های آبی با دمای بالا می باشند، بنابر این رشد این انگل ها در چشمه های آب گرم محتمل است. لازم به ذکر است نگلریاها به خصوص جنس نگلریا فالوری که از عوامل ایجاد کننده مننگوآنسفالیت آمیبی بوده نیز ترموفیل هستند و قادرند درجات بالای دمایی را تحمل کنند و از مهم ترین مکان های زیست آنها چشمه های آب گرم می باشد (۲). در حال حاضر اطلاعات جامعی در زمینه آلودگی چشمه های آب گرم از نظر وجود باکتری ها، قارچ ها و آمیب های آزادزی و سایر میکروارگانیسم ها در دسترس نمی باشد. با این حال اگر این چشمه ها به آمیب های آزادزی و سایر میکروارگانیسم ها آلوده باشند، شاهد بروز بیماری ها و عوارض شناخته شده آنها در افرادی که از چشمه های آب گرم استفاده می کنند خواهیم بود. در تحقیقی که توسط سلگی و همکارانش در چشمه های آب گرم استان اردبیل انجام گرفت، ۲۰ درصد از چشمه های آب گرم به آکانتامبا آلوده بودند. در تحقیق آنها ورمی امباها و والکامفیده ها نیز مورد شناسایی قرار گرفتند (۹،۸). در تحقیق دیگری نیز که توسط بدیرزاده و همکاران در سال ۲۰۱۱ در چشمه های آب گرم سرعین استان اردبیل انجام گرفت، آلودگی چشمه های آب گرم این شهر به آمیب های آزادزی مشاهده گردید (۱۰). به دلیل افزایش تمایلات انسان ها به درمان های طبیعی و استقبال روز افزون از چشمه های آب گرم برای آب درمانی و درمان بیماری های گوناگون مانند بیماری های مفصلی، روماتیسمی، ضایعات و ناراحتی های پوستی و توجه به این امر که این چشمه ها از مکان های زیست آمیب های آزادزی پاتوژن به شمار می روند و همچنین رشد روز افزون کراتیت آمیبی در



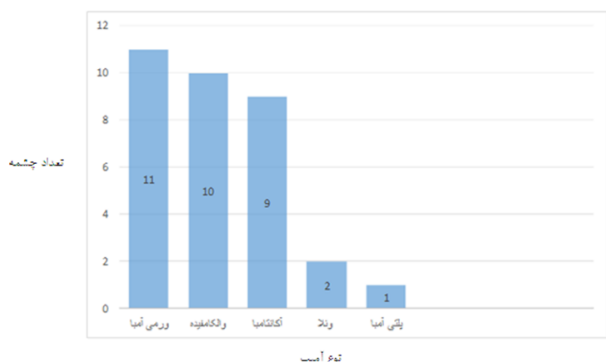
نمودار ۱. دمای چشمه‌های آب گرم بهسازی شده استان مازندران (پاییز سال ۱۳۹۳)

۹ (۴۰/۹٪) ایزوله، ونلا با تعداد ۲ (۹/۰۹٪) ایزوله و پلتی آمبا با تعداد ۱ (۴/۵۴٪) ایزوله گزارش شدند (نمودار ۲، جدول ۲). آکانتامبا با کیست‌های دولایه ستاره‌ای شکل و اشکال هندسی با اندوکیست و تروفوزوئیت‌های مسطح تک هسته‌ای و گاه چند هسته‌ای با پاهای کاذب (آکانتوپودیا) مشاهده شدند. والکامفیدها با کیست‌های گرد دو لایه و تروفوزوئیت‌های کرمی شکل با اندازه‌ای در حدود ۱۲-۱۸ میکرون، ورمی آمبا با کیست‌های گرد و دولایه اما کوچک‌تر از والکامفیدها و همچنین تروفوزوئیت‌های کرمی شکل کوچک‌تر از والکامفیدها و سوزنی شکل با اندازه‌ای در حدود ۱۰-۷ میکرون و ونلا با تروفوزوئیت‌های باد بزی شکل مورد شناسایی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که آمیب ونلا فاقد کیست می‌باشد (شکل ۱).

مدت دو ماه هر روز مورد بررسی قرار گرفتند و در طی این روند پلیت‌هایی که حاوی ایزوله‌های مثبت بودند، وارد مراحل کلونینگ و خالص سازی شدند. برای این منظور آمیب‌های آزادزی از محیط کشت اولیه که آمیب‌ها در آنها به صورت میکس حضور داشتند، به محیط کشت جدید منتقل گردیدند. این امر به منظور خالص سازی ایزوله‌ها و بررسی بهتر و دقیق‌تر و همچنین استفاده از این ایزوله‌ها برای رنگ آمیزی تری کروم برای مطالعه بیشتر صورت گرفت. در نهایت نتایج حاصل از مشاهده و میزان فراوانی آمیب‌های آزادزی در چشمه‌های بهسازی شده آب گرم استان مازندران به ثبت رسید.

## یافته‌ها

تعداد ۶۶ نمونه از ۲۲ چشمه آب گرم بهسازی شده در استان مازندران بررسی شدند. از هر چشمه آب گرم بهسازی شده، ۳ نمونه از نقاط مختلف جمع آوری گردید که در بررسی نمونه‌ها هر ۳ نمونه تهیه شده از هر چشمه از لحاظ آلودگی حاوی ایزوله‌های یکسانی از آمیب‌های آزادزی بودند. از دلایل تهیه ۳ نمونه از نقاط مختلف هر چشمه، پوشش دادن کل چشمه و بررسی کامل‌تر آن از لحاظ آلودگی به آمیب‌های آزادزی بود. از ۲۲ چشمه آب گرم مورد بررسی، ۱۷ چشمه (۷۷/۲۷٪) از ۲۲ چشمه مورد بررسی به آمیب‌های آزادزی آلوده بودند که آمیب ورمی آمبا با تعداد ۱۱ (۵۰٪) ایزوله، والکامفیده با تعداد ۱۰ (۴۵/۴۵٪) ایزوله، آکانتامبا با تعداد



نمودار ۲. ایزوله‌های آمیب‌های آزادزی جدا شده از چشمه‌های آب گرم بهسازی شده استان مازندران

تروفوزوئیت‌های ورمی آمبا و والکامفیده E و نلا، F-پلنتی آمبا در محیط کشت باکتوآگار با میکروسکوپ نوری (بزرگ نمایی ۱۰۰x).

### بحث

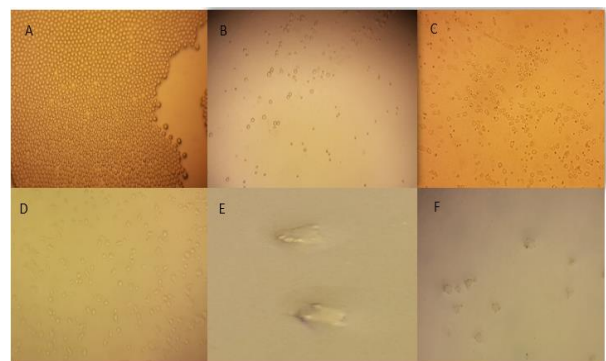
همان گونه که اشاره شد تا کنون مطالعه و بررسی در خصوص وجود آمیب‌های آزادی در چشمه‌های آب گرم کشور انجام نشده است و تنها دو مطالعه در مورد چشمه‌های آب گرم استان اردبیل صورت گرفته است. اولین مطالعه توسط بدیرزاده و همکاران در سال ۲۰۱۱ در چشمه‌های آب گرم سرعین انجام گرفت که از ۷ چشمه آب گرم ۲۸ نمونه جمع آوری و بررسی گردید که در نهایت ۱۲ نمونه (۴۲/۹٪) به آمیب‌های آزادی آلوده بودند. یک نمونه (۳/۶٪) به آمیب آکانتامبا و ۱۱ نمونه دیگر (۳۹/۳٪) تنها به آمیب والکامفیده آلوده بودند (۱۰). در این مطالعه تعداد چشمه‌های آب گرم مورد بررسی اندک بوده و کل استان اردبیل پوشش داده نشده است و بیشتر ایزوله‌های به دست آمده والکامفیده گزارش شده است. اما در تحقیق حاضر تمام چشمه‌های بهسازی شده آب گرم استان مازندران پوشش داده شد و نمونه‌ها از لحاظ تمام جنس‌های خانواده آمیب‌های آزادی مورد بررسی قرار گرفت. به علاوه، در اکثر نمونه‌ها شاهد حضور چند جنس از آمیب‌های آزادی در کنار هم بودیم. در این بررسی، در ۹ چشمه از ۲۲ چشمه آمیب آکانتامبا شناسایی گردید. سلگی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در طی مطالعات و بررسی چشمه‌های آب گرم استان اردبیل به این نتیجه دست یافتند که ۲۰ درصد از چشمه‌های آب گرم این استان به آکانتامبا آلوده می‌باشند. لازم به ذکر است که در مطالعه آنها ورمی آمباها و والکامفیده‌ها نیز ایزوله شده بودند (۹،۸). در مطالعه این محققین چشمه‌های آب گرم بیشتری مورد بررسی قرار گرفت و هدف اصلی شناسایی آمیب آکانتامبا بود، اما در کنار این شناسایی آمیب‌های خانواده والکامفیده نیز در چند نمونه گزارش شدند. در تحقیق حاضر، هدف جداسازی انواع آمیب‌های آزادی بود. در مطالعه‌ای که توسط محمودی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در استان گیلان صورت گرفت، ۲۷ نمونه از آب‌های سطحی رودخانه‌ها و چشمه‌ها جمع‌آوری و پس از فیلتراسیون و کشت ۱۹ نمونه از ۲۷ نمونه معادل (۷۰/۳ درصد) به آکانتامبا آلوده بودند (۱۲). در این بررسی بیشتر آب‌های سطحی و چشمه‌های آب سرد مورد مطالعه قرار گرفت و هدف اصلی ایزولاسیون و جداسازی آمیب آکانتامبا در این منابع آبی بود. اما تحقیق حاضر منحصر بر روی چشمه‌های آب گرم صورت گرفته و انواع آمیب آزادی مورد شناسایی قرار گرفته است. این نکته حائز اهمیت است که در چشمه‌های

جدول ۱. میزان اسیدیته و قلیایی بودن چشمه‌های آب گرم بهسازی شده استان مازندران

چشمه‌های آب گرم با pH قلیایی	چشمه‌های آب گرم با pH اسیدی
نور(لاویج)	رامسر(آب گرم شماره ۱)
نور(لاویج ۲)	رامسر(سادات شهر)
تنکابن(فلکده)	رامسر(آب گرم پل)
بابل(آزو)	رامسر(رمک)
آب گرم چالوس (لله جار)	رامسر(آب گرم سیاه)
آب گرم چالوس (دلیر)	رامسر(آب گرم گرما)
آب گرم چالوس (کندوا)	رامسر(آب گرم مادرشاه)
آب گرم امل(لاریجان شاه عباسی)	رامسر (آب گرم کتالم)
آب گرم امل (لاریجان ۲)	کلاردشت(آب گرم تلو)
آب گرم امل (استراباکو ۱)	کلاردشت(آب گرم پیش ترک)
آب گرم امل(استراباکو ۲)	
آب گرم امل (آب اسک)	

جدول ۲. آمیب‌های شناسایی شده به تفکیک شهرها و چشمه‌های آب گرم بهسازی استان مازندران

ردیف	نام و محل چشمه	ردیف	نام و محل چشمه	ردیف	نام و محل چشمه	ردیف	نام و محل چشمه
۱	رامسر	۱۲	رامسر(آب گرم گرما)	۱۳	کلاردشت	۱۴	آب گرم امل (لاریجان شاه عباسی)
۲	نور(لاویج)	۱۳	کلاردشت	۱۴	آب گرم امل (لاریجان شاه عباسی)	۱۵	آب گرم امل (لاریجان ۲)
۳	رامسر(سادات شهر)	۱۴	آب گرم امل (لاریجان شاه عباسی)	۱۵	آب گرم امل (لاریجان ۲)	۱۶	آب گرم امل (استراباکو ۱)
۴	رامسر(سادات شهر)	۱۵	آب گرم امل (لاریجان شاه عباسی)	۱۶	آب گرم امل (استراباکو ۱)	۱۷	آب گرم امل (استراباکو ۲)
۵	نور(لاویج ۲)	۱۶	آب گرم امل (استراباکو ۱)	۱۷	آب گرم امل (استراباکو ۲)	۱۸	آب گرم امل (آب اسک)
۶	تنکابن(فلکده)	۱۷	آب گرم امل (استراباکو ۲)	۱۸	آب گرم امل (آب اسک)	۱۹	آب گرم چالوس (لله جار)
۷	بابل(آزو)	۱۸	آب گرم امل (آب اسک)	۱۹	آب گرم چالوس (لله جار)	۲۰	آب گرم چالوس (کندوا)
۸	رامسر(آب گرم پل)	۱۹	آب گرم چالوس (لله جار)	۲۰	آب گرم چالوس (کندوا)	۲۱	آب گرم چالوس (کندوا)
۹	رامسر(رمک)	۲۰	آب گرم چالوس (کندوا)	۲۱	آب گرم چالوس (کندوا)	۲۲	آب گرم امل (استراباکو ۱)
۱۰	رامسر(آب گرم سیاه)	۲۱	آب گرم چالوس (کندوا)	۲۲	آب گرم امل (استراباکو ۱)		
۱۱	کلاردشت(آب گرم تلو)	۲۲	آب گرم امل (استراباکو ۱)				
۱۲	رامسر						
	(آب گرم مادرشاه)						



شکل ۱. A- کیست‌های کلون شده آکانتامبا، B-کیست‌های والکامفیده و ورمی آمبا، C-تروفوزوئیت‌های آکانتامبا، D-

کلی بود قرار داده شدند. ۳۳ نمونه (۲۲ درصد) از ۱۵۰ نمونه از نظر وجود آمیب‌های آزادی مثبت شدند. لازم به ذکر است که آمیب‌ها با توجه به ویژگی‌های مورفولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند و بیشترین آمیب جدا شده آکانتامبا گزارش شد (۱۷). در مطالعه‌ای که توسط Sadaka و همکارانش در سال ۱۹۹۴ در اسکندریه انجام گرفت. نمونه‌هایی از منابع آب‌های مختلف اسکندریه و بینی ۵۰۰ کودک سالم ساکن مناطق مجاور این منابع برای جداسازی آمیب‌های آزادی جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. این نمونه‌ها در محیط کشت آگار ۱/۵ درصد همراه با باکتری اشرشیا کلی قرار داده شدند. سپس با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژی محیط‌های کشت مورد بررسی و مشاهده قرار گرفتند. در این مطالعه کیست‌های نگلریا، آکانتامبا از آب‌های کانال‌های آب و زهکش‌ها جدا شدند. در بینی ۶ کودک سالم مجاور این منابع آمیبی نیز خانواده آمیب نگلریا مورد شناسایی قرار گرفت، اما در نمونه‌های آب آشامیدنی و همچنین استخرها حضور آمیب‌های آزادی مشاهده نشد (۱۸). در بررسی این محققین همانند تحقیق حاضر مطالعه آمیب‌های آزادی تنها از راه مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفت و بیشترین آمیب گزارش شده در تحقیق آنها مربوط به آکانتامبا می‌باشد.

لازم به ذکر است که اخیراً Niyati و همکاران در سال ۲۰۱۵، طی تحقیقی نشان دادند که آب‌های تصفیه شده و کلرینه نیز می‌توانند به آمیب‌های آزادی آلوده باشند (۲۰). مطالعات فوق‌نمایانگر آلودگی منابع آبی به آمیب‌های آزادی بالقوه پاتوژن بوده که این موضوع می‌تواند تهدیدی جدی برای افراد مستعد خطر باشد.

از مزایای این تحقیق میتوان به این موارد اشاره نمود که این مطالعه برای اولین بار در استان مازندران انجام گرفته است و تا قبل از آن مطالعه و پژوهشی در خصوص آلودگی چشمه‌های آب گرم استان از لحاظ وجود آمیب‌های آزادی صورت نگرفته است. هنگام بررسی از هرچشمه ۳ نمونه از نقاط مختلف چشمه تهیه شد و با این کار میزان آلودگی کل چشمه مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی زنگ خطر این امر به صدا در می‌آید که اکثر این چشمه‌ها به عنوان مکان زیست آمیب‌های آزادی به شمار می‌روند و این آمیب‌ها موجب بروز بیماری‌هایی همچون کراتیت، منگوانسفالیت، انسفالیت گرانولوماتوز آمیبی، ضایعات و بثورات پوستی در افراد با نقص سیستم ایمنی و همچنین افراد با سیستم ایمنی کارآمد می‌شود. به همین منظور باید قبل از استفاده از چشمه‌های آب

آب گرم شاهد حضور بیشتر افراد و در نتیجه احتمال ابتلا به بیماری‌های ناشی از خانواده آمیب‌های آزادی نسبت به منابع مورد مطالعه در تحقیق ذکر شده می‌باشیم. در بررسی که توسط Stockman و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در اوهایو آمریکا انجام شد، برای آگاهی از شیوع آمیب‌های آزادی در منابع آب‌های خانگی نمونه‌های آب خانگی از دو شهر اوهایو جمع‌آوری و از نظر وجود آمیب‌های آزادی مورد بررسی قرار گرفت. آمیب‌های آزادی موجود در این منابع ایزوله و توسط ویژگی‌های مورفولوژیک شناسایی شدند. در مجموع، ۲۴۵۴ نمونه از ۴۶۷ منابع آب خانگی مورد بررسی قرار گرفت. آمیب‌های آزادی در نمونه آب جدا شده از ۳۷۱ منبع آب خانگی با فراوانی ۷۹ درصد به ثبت رسید. محل‌هایی که حضور آمیب‌های آزادی در آنها محتمل‌تر بود، سر دوش (۵۲ درصد) و شیر آشپزخانه (۵۰ درصد) بودند. گونه‌های شناسایی شده آکانتامبا، ورمی‌آمبا و والکامفیده بودند (۱۳). موحدی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مواجهه با یک کودک ۵ ماهه با سابقه تب و اختلالات بینایی (eye gaze) به مدت سه روز از طریق آزمایشات CT اسکن هیدروسفالی مشاهده کردند. آزمایش‌های خون، ادرار و کشت مدفوع بیمار نرمال گزارش شده بود و در آزمایش مایع مغزی نخاعی عفونت باکتریایی دیده نشده بود، ولی با تهیه لام گسترش مرطوب از مایع مغزی نخاعی آمیب نگلریا فلوری مشاهده و برای اولین بار در ایران گزارش شد (۱۴). این تحقیق، لزوم بررسی بیماران انسفالیت از لحاظ آلودگی به آمیب‌های آزادی پاتوژن را مورد اهمیت قرار داده است. متأسفانه در ایران اطلاعات کمی در خصوص انسفالیت‌های ناشی از آمیب‌های آزادی پاتوژن در دسترس می‌باشد و این تنها مورد گزارش شده در ایران بوده و زنگ خطری برای احتمال آلودگی افراد به آمیب‌های آزادی پاتوژن و در نهایت ابتلا به انسفالیت مغزی می‌باشد. تحقیق دیگری که توسط Niyati و همکارانش در سال ۲۰۰۸ انجام شد، نشان داد که در یکی از بیماران کراتیت، عفونت مخلوط آکانتامبا و والکامفیا عامل کراتیت آمیبی است (۱۵). عابد خجسته و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۳ در ایران یک مورد کراتیت آمیبی ناشی از آمیب آزادی هارتمنلا (ورمی‌آمبا) را در بررسی لنز تماسی یک بیمار مبتلا به کراتیت مشاهده نمودند (۱۶). در مطالعه‌ای که توسط Coskun و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در سیواس ترکیه انجام شد، در مجموع ۱۵۰ نمونه آب از شش بخش سیواس جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها فیلتر و در محیط کشت باکتو آگار که حاوی باکتری اشرشیا

تعداد چشمه‌های آلوده به آمیب‌های آزادی قابل توجه بوده و نگرانی را برای افراد محلی، توریست‌ها، گردشگران و مسافران که از این چشمه‌ها استفاده می‌نمایند به وجود می‌آورد. با توجه به عوارض شناخته شده این آمیب‌ها مانند کراتیت، مننگو انسفالیت، انسفالیت گرانولوماتوز آمیبی و ضایعات پوستی، انجام تحقیقات مداخله‌ای برای کاهش آلودگی و بیماری‌های مرتبط با آمیب‌های آزادی در چشمه‌های آب گرم استان مازندران و همچنین سایر چشمه‌های آب گرم کشورمان را امری ضروری دانسته و نصب علائم هشدار دهنده در کنار چشمه‌های آب گرم جهت توجه افراد در معرض خطر و سایر افراد را توصیه می‌نماییم.

### تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جهت تامین اعتبار طرح فوق با شماره ۱۳۵۰۵-۹۱-۱۳۹۳ قدردانی می‌شود.

گرم این چشمه‌ها به طور کامل توسط دستگاه‌ها و فیلترهای مخصوص پاکسازی و با اضافه کردن موادی که میکروارگانسیم‌ها و آمیب‌ها را از بین می‌برند، خطر آلوده شدن افراد را به حداقل رساند و از آلوده شدن افراد به این آمیب‌ها و بیماری‌های متعاقب آنها جلوگیری به عمل آورد. در همین راستا باید در کنار چشمه‌های آب گرم تابلوها و علائم هشدار دهنده‌ای نصب گردد که افراد را از حضور این آمیب‌ها و خطرات آنها آگاه سازد. اما از نقاط ضعف این تحقیق می‌توان به این موارد اشاره نمود که بررسی حاضر منحصر بر روی چشمه‌های آب گرم بهسازی شده استان مازندران صورت گرفته است و درخصوص سایر چشمه‌های آب گرم غیربهسازی شده و همچنین چشمه‌های آب سرد و معدنی استان مطالعه و بررسی صورت نگرفت. همچنین به دلیل عدم امکانات از عمق چشمه‌ها و همچنین انشعابات چشمه‌ها و لوله‌ها و اتصالاتی که آب چشمه‌ها را برای مصارف مردم منتقل می‌کرد، نمونه‌گیری انجام نشد که احتمال آن می‌رود که شاید میزان آلودگی در محل‌های ذکر شده بیشتر باشد. در نهایت به نظر می‌رسد

### REFERENCES

1. Page FC. A new key to freshwater and soil gymnoamoebae. Freshwater Biological Association, The Ferry House, Ambleside, Cumbria, England, 1988.
2. Marciano-Cabral F, Cabral G. Acanthamoeba spp. as Agents of Disease in Humans. Clin Microbiol Rev 2003;273-307.
3. Khan NA. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev 2006;30:564-95.
4. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol 2004; 34: 1001-27.
5. Zabel RW. Acanthamoeba keratitis. Increasing the index of suspicion. Can J Ophthalmol 1995; 30:33-34.
6. Olina M, Aluffi Valletti P, Pia F, Toso A, Borello G, Policarpo M, et al. Hydrological indications in the therapy of pharyngitis. Recenti Prog Med 2008; 99:314-21.
7. Sukthana Y, Lekkla A, Sutthikornchai C, Wanapongse P, Vejjajiva A, Bovornkitti S. Spa, springs and safety. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2005; 10-16.
8. Solgi R, Niyayati M, Haghghi A, Taghipour N, Tabaei SJ, Eftekhar M, et al. Thermotolerant Acanthamoeba spp. isolated from therapeutic hot springs in Northwestern Iran. J Water Health. 2012; 10:650-56.
9. Solgi R, Niyayati M, Haghghi A, Mojarad EN. Occurrence of thermotolerant *Hartmannella vermiformis* and *Naegleria Spp.* in hot springs of Ardebil province, Northwest Iran. Iran J Parasitol 2012;7:47-52.
10. Badirzadeh A, Niyayati M, Babaei Z, Amini H, Badirzadeh H, Rezaeian M. Isolation of free-living amoebae from sarein hot springs in ardebil province, iran. Iran J Parasitol 2011;6: 1-8.
11. Niyayati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Mohebbi M, Maghsood AH, et al. Genotyping of Acanthamoeba isolates from clinical and environmental specimens in Iran. Exp Parasitol 2009;121:242-45.
12. Mahmoudi MR, Taghipour N, Eftekhar M, Haghghi A, Karanis P. Isolation of Acanthamoeba species in surface waters of Gilan province-north of Iran. Parasitol Res 2012;110:473-77.
13. Stockman LJ1, Wright CJ, Visvesvara GS, Fields BS, Beach MJ. Prevalence of Acanthamoeba spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA--1990-1992. Parasitol Res 2011;108:621-27.
14. Movahedi Z, Shokrollahi MR, Aghaali M, Heydari H. Primary Amoebic Meningoencephalitis in an Iranian Infant. Case Rep Med 2012:782854.

15. Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Martín-Navarro CM, Mohebbali M, et al. First report of a mixed infection due to *Acanthamoeba* genotype T3 and *Vahlkampfia* in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. *Exp Parasitol* 2010; 126:89-90.
16. Abedkhozasteh H, Niyyati M, Rahimi F, Heidari M, Farnia S, Rezaeian M. First Report of *Hartmannella* keratitis in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. *Iran J Parasitol* 2013;8:481-85.
17. Coskun KA, Ozcelik S, Tutar L, Elald N, Tutar Y. Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. *Biomed Res Int* 2013;675145.
18. Sadaka HA, el-Nassery SF, Abou Samra LM, Awadalla HN. Isolation and identification of free-living amoebae from some water sources in Alexandria. *J Egypt Soc Parasitol* 1994;24:247-57.
19. 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;9;8:S1-6.
20. Niyyati M, Rezaeian M. Current status of *Acanthamoeba* in Iran: a Narrative review. *Iran J Parasitol*. 2015; In press.